

Université de Sherbrooke

Implication des récepteurs aux prostaglandines et des isoenzymes de la cyclooxygénase  
dans l'ostéoclastogénèse humaine

par

Maximilien Lora

Département d'Immunologie

Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de  
*Philosophiae Doctor* (Ph. D.)

15 juin 2003



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-494-14866-7*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-494-14866-7*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Je dédie cette thèse  
À mes parents  
Wayne et Aurore,  
Et à ma sœur Fannie.

Advice given by Merlin to the young Arthur :

You may grow old and trembling in your anatomies,  
you may lie awake at night listening to the disorder of your veins,  
you may miss your only love,  
you may see the world about you devastated by evil lunatics,  
or know your honor trampled in the sewers of baser minds.  
There is only one thing for it then **to learn**.  
Learn why the world wags and what wags it.  
That is the only thing which the mind can never exhaust,  
never alienate, never be tortured by,  
never fear or distrust, and never dream of regretting.

The Once and Future King,  
T.H. White  
1939

## TABLE DES MATIÈRES

Table des Matières .....	iii
Publications.....	vii
Liste des résumés de communication .....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations.....	xii
Résumé.....	xiv
Introduction.....	15
1. Évolution de l'os des mammifères.....	15
1.1 Renouvellement osseux. ....	16
1.1.2 Ostéoclaste .....	18
1.2 Contrôle de l'ostéoclastogénèse.....	20
1.2.1 Les ostéoclastes dérivent de précurseurs monocytaires, de monocytes ou de macrophages (figure 1) .....	20
1.2.2 Caractéristiques des précurseurs ostéoclastiques.....	25
1.2.3 Systèmes <i>in vitro</i> de différenciation des ostéoclastes .....	28
1.2.4 Rôle du micro-environnement de l'os sur la formation d'ostéoclastes.....	29
1.3 Mécanismes de la dégradation osseuse.....	33
1.3.1 Fusion cellulaire.....	33
1.3.2 Attachement de l'ostéoclaste à l'os.....	34
1.3.3 Ostéoclastes matures et activités.....	35
1.3.3.1 Sécrétion acide .....	35
1.3.3.2 Dégradation enzymatique de la matrice organique.....	37
1.4 Contrôle de l'activité ostéoclastique implique plusieurs voies.....	38
1.4.1 Prostaglandines et os.....	39
1.4.1.1 Prostaglandines et résorption osseuse .....	39
1.4.1.2 Prostaglandines et formation osseuse .....	40

1.4.2 Rôles physiologiques des prostaglandines dans l'os .....	41
1.4.3 Rôles pathophysiologiques .....	42
2. Inflammation, les isoenzymes de la cyclooxygénase et les prostaglandines .....	47
2.1 Isoenzymes de la cyclooxygénase .....	52
2.2 Récepteurs aux prostaglandines .....	53
3. Hématopoïèse chez le fœtus.....	58
Problématique .....	60
Matériel et méthodes.....	61
1. Anti Inflammatoire Non Stéroïdiens (AINS).....	61
2. Agonistes et antagonistes des récepteurs aux prostaglandines .....	61
3. Recherche du modèle de culture .....	61
3.1 Culture de l'os dégénéré .....	62
3.2 Coculture des cellules de rate fœtale humaine et des cellules SaOS-2.....	62
3.3 Coculture des cellules de rate fœtale humaine et des cellules SaOS-2 fixées ....	63
3.4 Culture des cellules du foie pour le système d'ostéoclastogénèse.....	64
4. Expression de la TRAP .....	65
5. Extraction d'ARN <sub>total</sub> .....	65
6. Essais de transcriptase inverse avec une réaction de polymérase en chaîne.....	66
7. Essai pour déterminer l'implication des COX dans l'ostéoclastogénèse.....	69
8. Essai pour déterminer l'implication des PGs dans l'ostéoclastogénèse .....	69
8.1 Avec les agonistes.....	69
8.2 Avec les antagonistes.....	70
9. ELISA Sandwich pour OPG .....	70
10. Extraction des ostéoclastes .....	71

11. Essais des PG chez les ostéoclastes matures.....	72
12. Coloration des filaments de F-actine .....	72
13. Statistiques ANOVA.....	73
Résultats .....	74
1. Culture de l'os dégénéré .....	74
2. Coculture moelle osseuse humaine fœtale et ostéoblaste humain .....	78
3. Coculture cellules de la rate humaine fœtale et SaOS-2.....	78
4. Culture des cellules du foie humain fœtal.....	82
5. Essais des AINS .....	88
6. Détermination des récepteurs impliqués lors de l'ostéoclastogénèse .....	95
6.1 Étude du récepteur DP .....	95
6.2 Étude des récepteurs EP.....	98
6.2.1 Étude avec les antagonistes des récepteurs EP .....	99
6.3 Étude du récepteur FP .....	106
6.3.1 Étude avec les antagonistes des récepteurs FP .....	106
6.4 Étude du récepteur IP.....	111
6.5 Étude des récepteurs TP.....	113
6.5.1 Étude avec les antagonistes des récepteurs TP .....	113
7. Implication de l'ostéoprotégérine dans l'ostéoclastogénèse observé .....	117
7.1 Récepteurs aux PGs et OPG .....	119
8. Anneau d'actine des ostéoclastes humains matures et les prostaglandines .....	128
Discussion .....	130
1. Système d'os dégénéré.....	130
2. Modèles avec coculture.....	131
2.1 Moelle osseuse fœtale et ostéoblaste humain .....	131

2.2 Rate fœtale humaine et ostéoblastes SaOS-2.....	131
2.3 Rate fœtale humaine et ostéoblastes SaOS-2 fixés.....	132
3. Modèle d'ostéoclastogénèse avec la culture des cellules du foie .....	134
3.1 Amélioration pour le système .....	135
4. Ostéoclastogénèse et cyclooxygénases .....	136
5. Ostéoclastogénèse et récepteurs aux prostaglandines.....	139
6. Ostéoprotégérine .....	142
6.1 Ostéoprotégérine effet local et/ou systémique .....	143
6.2 Inhibition des COX et expression du RANKL .....	144
7. Anneau d'actine .....	145
8. Éthique de l'utilisation des tissus fœtaux pour la recherche.....	146
Conclusion .....	148
Perspectives.....	150
1. Système d'ostéoclastogénèse .....	150
2. Vérification de nouveaux produits antiostéoclastogénèse .....	150
2.1 Étude des composés capables de stimuler l'apoptose des ostéoclastes .....	150
3. Prostaglandines et ostéoprotégérine.....	151
Remerciements.....	152
Bibliographie.....	153

## PUBLICATIONS

DE SOUZA GE, CARDOSO RA, MELO MC, FABRICIO AS, SILVA VM, LORA M, de BRUM-FERNANDES AJ, RAE GA, FERREIRA SH, ZAMPRONIO AR. (2002) A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats. *Inflamm Res.*; **51**(1) : 24-32.

FORTIER I, PATRY C, LORA M, SAMADFAN R, de BRUM-FERNANDES AJ. (2001) Immunohistochemical localization of the prostacyclin receptor (IP) human bone. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*; **65**(2) : 79-83.

PETERS RR, SALEH TF, LORA M, PATRY C, de BRUM-FERNANDES AJ, FARIAS MR, RIBEIRO-DO-VALLE RM.(1999) Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sci.*; **64**(26) : 2429-2437.

LORA M, DENAULT JB, LEDUC R, de BRUM-FERNANDES AJ.(1998) Systematic pharmacological approach to the characterization of NSAIDs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*; **59**(1) : 55-62.

MORISSET S, PATRY C, LORA M, de BRUM-FERNANDES AJ.(1998) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1alpha, tumor necrosis factor-alpha, glucocorticoids, and 17beta-estradiol. *J Rheumatol.*; **25**(6) : 1146-1153.

FERNANDES AJ, LORA M, PATRY C, MORISSET S, SARRAZIN P, MACIEL F.(1997) Parathyroid hormone induction of cyclooxygenase-2 expression in human osteoblasts depends on both cyclic AMP and calcium-dependent pathways. *Adv Exp Med Biol.*; **433** : 303-306.

MACIEL FM, SARRAZIN P, MORISSET S, LORA M, PATRY C, DUMAIS R, DE BRUM-FERNANDES AJ. (1997) Induction of cyclooxygenase-2 by parathyroid hormone in human osteoblasts in culture. *J Rheumatol.*; **24**(12) : 2429-2435.

LORA M, MORISSET S, MENARD HA, LEDUC R, de BRUM-FERNANDES AJ. (1997) Expression of recombinant human cyclooxygenase isoenzymes in transfected COS-7 cells in vitro and inhibition by tenoxicam, indomethacin and aspirin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*; **56**(5) : 361-367.

de BRUM-FERNANDES AJ, LAPORTE S, HEROUX M, LORA M, PATRY C, MENARD HA, DUMAIS R, LEDUC R. (1994) Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.*; **198**(3) : 955-960.



## **LISTE DES RÉSUMÉS DE COMMUNICATION**

LORA, M., SAMADFAM, R., de BRUM-FERNANDES, A.J. (2002) The eight

Canadian Connective Tissue Conference, Sherbrooke 26 et 27 Mai.

LORA, M., de BRUM-FERNANDES, A.J. (2001) The seventh Canadian Connective

Tissue Conference, Toronto 26 et 27 Mai.

LORA, M., de BRUM-FERNANDES, A.J. (2000) The sixth Canadian Connective Tissue

Conference, Université de Laval, Québec 26 et 27 Mai.

LORA, M., de BRUM-FERNANDES, A.J. (2000) Club de Recherche Clinique du

Québec, Bromont Québec, Juin.

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Récepteurs aux $\text{PGD}_2$ , $\text{PGF}_{2\alpha}$ , $\text{PGI}_2$ et thromboxane
Tableau 2	Récepteurs à la $\text{PGE}_2$
Tableau 3	Amorces pour PCR

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	SCHÉMA DE L'OSTÉOCLASTOGENÈSE.....	21
FIGURE 2	SCHÉMA DE LA DIFFÉRENTIATION ET DE LA FONCTION DES OSTÉOCLASTES AVEC LE SUPPORT DES OSTÉOBLASTES OU DES CELLULES STROMALES .....	32
FIGURE 3	EFFETS DE LA DEXAMÉTHASONE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> AVEC LE SYSTÈME DE DÉGÉNÉRESCENCE DE L'OS FŒTAL .....	76
FIGURE 4	EFFETS DES AINS AVEC LE PROTOCOLE DE DÉGÉNÉRESCENCE DE L'OS SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	77
FIGURE 5	DÉMONSTRATION DE LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> LORS DE LA COCULTURE DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE FŒTALE ET DES OSTÉOBLASTES HUMAINS .....	80
FIGURE 6	EFFETS DES AINS AVEC LE PROTOCOLE DE LA RATE HUMAINE FŒTALE AVEC SAOS-2 FIXÉ SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	81
FIGURE 7	DÉMONSTRATION DE LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> LORS DE LA CULTURE DU FOIE HUMAIN FŒTAL.....	84
FIGURE 8	EXEMPLES DE CELLULES TRAP <sup>+</sup> MULTINUCLÉÉES OBTENUES AVEC LA CULTURE DU FOIE HUMAIN FŒTAL SUR LAMELLE DE VERRE .....	85
FIGURE 9	RÉSULTATS DE L'ÉTUDE RT-PCR POUR LE RÉCEPTEUR À LA CALCITONINE.....	86
FIGURE 10	RÉSULTATS DE L'ÉTUDE RT-PCR POUR LES MARQUEURS D'OSTÉOCLASTES OBTENUS À PARTIR DES CULTURES DU FOIE HUMAIN FŒTAL.....	87
FIGURE 11	EFFET DE L'INDOMÉTACINE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	90
FIGURE 12	EFFET DE L'IBUPROFÈNE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	91
FIGURE 13	EFFET DU DFU SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	92
FIGURE 14	EFFET DU NS-398 SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	93
FIGURE 15	EFFET DU VALÉRYL SALICYLATE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	94
FIGURE 16	EFFET DU BW245C SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	96
FIGURE 17	EFFET DU BW245C SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	97
FIGURE 18	EFFET DES AGONISTES EP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITES PAR L'INDOMÉTACINE .....	101
FIGURE 19	EFFET DE LA PROSTAGLANDINE E <sub>2</sub> SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	102
FIGURE 20	EFFET DU 11 DÉOXY PGE <sub>1</sub> SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	103

FIGURE 21	EFFET DU 17-PHÉNYL TRINOR PROSTAGLANDINE E <sub>2</sub> SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	104
FIGURE 22	EFFETS DES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS EP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	105
FIGURE 23	EFFET DU FLUPROSTÉNOLOL SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	108
FIGURE 24	EFFET DU FLUPROSTÉNOLOL SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	109
FIGURE 25	EFFETS DES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS FP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	110
FIGURE 26	EFFET DE LA CARBAPROSTACYCLINE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE.....	112
FIGURE 27	EFFET DU U46619 SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	114
FIGURE 28	EFFET DU U46619 SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE .....	115
FIGURE 29	EFFETS DE L'ANTAGONISTE DES RÉCEPTEURS TP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP <sup>+</sup> .....	116
FIGURE 30	RÉSULTATS DE L'ÉTUDE RT-PCR POUR L'OSTÉOPROTÉGÉRINE OBTENUS DES CULTURES DU FOIE HUMAIN FŒTAL .....	121
FIGURE 31	IMPLICATION DE L'OPG DANS LE SYSTÈME DE DIFFÉRENTIATION OSTÉOCLASTIQUE DU FOIE HUMAIN FŒTAL .....	122
FIGURE 32	IMPLICATION DE L'OPG DANS LA RÉPONSE AU 11 DÉOXY PGE <sub>1</sub> DANS LE SYSTÈME DE DIFFÉRENTIATION OSTÉOCLASTIQUE DU FOIE FŒTAL HUMAIN.....	123
FIGURE 33	EFFETS DES AINS SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CULTURES DE CELLULES DE FOIE HUMAIN FŒTAL .....	124
FIGURE 34	EFFET DE LA PGE <sub>2</sub> SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CELLULES DE FOIE FŒTAL .....	125
FIGURE 35	EFFETS DES AGONISTES EP1 ET EP4 SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CULTURES DE CELLULES DE FOIE HUMAIN FŒTAL .....	126
FIGURE 36	EFFETS DES AGONISTES POUR LES RÉCEPTEURS DP, FP, IP ET TP SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CULTURES DE CELLULES DE FOIE HUMAIN FŒTAL.....	127
FIGURE 37	ACTIONS DES AGONISTES DES RÉCEPTEURS DP, FP, IP ET TP SUR LE NOMBRE D'OSTÉOCLASTES MATURES AVEC UN ANNEAU D'ACTINE.....	129

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CAII	Anhydrase carbonique II
CFU	Colony forming unit
CFU-GM	Colony forming unit- granulocyte macrophage
COX	Cyclooxygénase
CTR	Récepteur à la calcitonine
DEPC	Diéthylpirocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	Facteur de croissance épidermique
ELISA	Enzyme linked immunoadsorbent assay
FBS	Sérum fœtal bovin
GAPDH	Glycéraldéhydephosphate déhydrogénase
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
hCOX-1	Cyclooxygénase-1 humaine

hCOX-2	Cyclooxygénase-2 humaine
$\alpha$ MEM	Minimum Essential Medium Eagle modification Alpha
MMP-9	Métalloprotéinase –9
ODF	Facteur de différenciation d'ostéoclastes, RANKL
OPG	Ostéoprotégérine
OPGL	Ostéoprotégérine ligand, RANKL
PBS	Tampon Phosphate Salin
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandine F <sub>1<math>\alpha</math></sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandine G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PGs	Prostaglandines
PLC	Phospholipase C
RANK	Récepteur activateur du Nf- $\kappa$ b
RANKL	Ligand du récepteur activateur du Nf- $\kappa$ b
sem	Erreur moyenne standard
TNF	Facteur Nécrosant Tumoral
TRAP	Acide phosphatase résistant au tartrate
TxA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>

## RÉSUMÉ

Université de Sherbrooke  
IMPLICATION DES PROSTAGLANDINES ET DES ISOENZYMES DE LA  
CYCLOOXYGÉNASE DANS L'OSTÉOCLASTOGÉNÈSE HUMAINE

Par  
Maximilien Lora  
Département d'Immunologie  
Thèse présentée à la faculté de médecine  
En vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph. D.)  
Juin 2003

Les prostaglandines affectent la différenciation et l'activité des ostéoclastes *in vivo* et *in vitro* comme il a été démontré dans plusieurs modèles animaux. Par contre, les résultats décrits dans la littérature sont paradoxaux et même contradictoires. Nous croyons que ceci est partiellement dû à la complexité de la pharmacologie des prostaglandines. Alors, pour déterminer l'implication des prostaglandines (PG) et des cyclooxygénases (COX) dans l'ostéoclastogénèse humaine nous avons dans un premier temps développé un système d'ostéoclastogénèse humaine qui nous permet d'étudier la différenciation des cellules précurseurs en ostéoclastes. Deuxièmement, nous avons observé que l'inhibition des COX par l'indométacine et par l'ibuprofène augmente le nombre de cellules avec de l'acide phosphatase résistant au tartrate (TRAP<sup>+</sup>). Nous avons alors recherché quelles cyclooxygénases sont responsables de cette augmentation du phénotype ostéoclastique. Les inhibiteurs spécifiques de la COX-2, le DFU et le NS-398 ont augmenté le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. De plus, l'inhibition de la COX-1 par le valéryl salicylate n'a pas induit de variation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. Nous pouvons conclure que l'inhibition de la COX-2 participe à l'ostéoclastogénèse et que la COX-1 n'est pas importante dans ce phénomène. Finalement, l'augmentation du nombre des cellules TRAP<sup>+</sup> en présence d'inhibiteurs de la COX-2 démontre que des prostaglandines produites par celle-ci inhibent l'ostéoclastogénèse. Nous avons alors approfondi nos études pour déterminer les prostaglandines capables d'inhiber l'ostéoclastogénèse humaine ainsi que l'identification des récepteurs responsables de ce phénomène. La PGE<sub>2</sub> par l'intermédiaire des récepteurs EP1 et EP4 diminue l'ostéoclastogénèse. Alors que le U46619 a diminué l'ostéoclastogénèse par l'intermédiaire des récepteurs TP. De plus, nous avons vérifié l'implication de l'ostéoprotégérin (OPG) dans la régulation de l'ostéoclastogénèse observée lors des traitements avec les AINS et les prostaglandines. Les résultats sur la régulation de l'ostéoclastogénèse par EP1 et TP impliquent l'OPG. Avec les interventions pharmacologiques des inhibiteurs des COX et des agonistes des récepteurs aux prostaglandines, nous pourrions agir sur le rythme de différenciation des cellules précurseurs en ostéoclastes.

## INTRODUCTION

### 1. Évolution de l'os des mammifères

L'endosquelette s'est développé comme support aux muscles chez les vertébrés ancestraux qui vivaient dans un environnement d'eau salée à concentration stable. Chez les poissons cartilagineux sans os tels que les chondrichthyens, cette fonction de l'endosquelette reste inchangée. Par contre, la minéralisation du squelette pour produire un os primitif a permis un développement additionnel. Environ 80 % de la matrice de l'os de mammifère est de l'hydroxyapatite,  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{CaOH}_2$ , une source potentielle de calcium. Le calcium étant très important dans la signalisation cellulaire, un organisme capable de dégrader son os a une capacité accrue pour l'homéostasie du calcium, un avantage important dans un environnement avec peu de calcium. Les ostéoclastes, les cellules responsables de la dégradation de l'os, apparaissent chez les poissons-téléostéen (MOSS, 1965) qui se déplacent de l'eau salée vers l'eau douce. Dans des conditions faibles en calcium, comme l'eau douce, les ostéoclastes se forment par la fusion, à la surface de l'os, de précurseurs circulant sous le contrôle de cellules branchiales sensibles au calcium. L'homéostasie du calcium est contrôlée par les glandes parathyroïdiennes, même chez les vertébrés plus évolués. Ces glandes sont formées de cellules sensibles au niveau du calcium et produisent l'hormone parathyroïdienne, un polypeptide (BROWN *et al.*, 1993).

L'utilisation des minéraux squelettiques dans la régulation du métabolisme est particulièrement importante chez les vertébrés terrestres. Les ostéoclastes sont d'ailleurs très spécialisés chez ces vertébrés. Les adaptations augmentent l'efficacité de la



dégradation osseuse et ajoutent des mécanismes de contrôle qui balancent les fonctions de gérance des électrolytes squelettiques avec le maintien de l'architecture squelettique. La masse squelettique est un désavantage pour la vie sur la terre, ce qui a amené le développement d'une architecture vidée avec une bien meilleure force par poids. Les ostéoclastes sont intimement impliqués dans la formation de cette architecture avancée. Les ostéoclastes enlèvent le cartilage minéralisé qui est remplacé par de l'os lors de l'embryogenèse et aux plaques dcartilagineusertilagineuses pendant la croissance. Les ostéoclastes sont aussi responsables de l'enlèvement de l'os endommagé pour son remplacement et la guérison.

### **1.1 Renouvellement osseux.**

Le métabolisme osseux dépend de l'action coordonnée de deux types cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes (VERNEJOUL *et al.*, 1993). Les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse et les ostéoclastes, d'origine hématopoïétique, sont responsables de sa dégradation. L'intégration de la fonction de ces deux types cellulaires est nécessaire, lors du modelage osseux qui a lieu pendant la croissance de l'os (VERNEJOUL *et al.*, 1993), pour le maintien qualitatif et quantitatif du squelette durant la vie adulte (JOTEREAU *et al.*, 1978), pour réparer l'os après un traumatisme ou une fracture (PARDANAUD *et al.*, 1989), et enfin, pour assurer l'homéostasie du calcium sérique (COWLING *et al.*, 1992).

Chez les vertébrés, l'os mature est constitué de l'os cortical, surfaces plates d'os denses, dans lequel on retrouve l'os trabéculaire, un filet délicat d'os qui est orienté de façon à opposer les forces des charges de poids. Chez les vertébrés terrestres, le squelette est un organe vivant qui est régulièrement remplacé. Les cellules qui forment l'os, les

ostéoblastes, se différencient continuellement des cellules stromales pluripotentes, qui produisent aussi des fibroblastes et des adipocytes (PROKOP, 1997). Les ostéoblastes sécrètent une matrice osseuse organique. Plus de 90 % de cette matrice est formée de collagène de type I avec beaucoup de liaisons croisées. Le collagène est orienté le long des lignes de stress. Par la suite les ostéoblastes déposent les minéraux de l'hydroxyapatite dans la matrice, ce qui résiste à la compression. Ce modèle est léger et fort, néanmoins, l'os peut arquer de quelques degrés sous un certain poids et la structure est sujette à l'usure ou même à la fracture si son module d'élasticité est surpassé. L'hormone parathyroïdienne promeut la synthèse de l'os par les ostéoblastes ainsi que la formation d'ostéoclastes et leur activité. La combinaison de la synthèse de l'os et de sa dégradation se fait généralement en même temps dans le processus de renouvellement.

Cette architecture complexe possède une large surface qui est idéale pour des cycles juxtaposés de synthèse et de dégradation de surface lors des stress de support de poids. L'espace creux de la moelle est occupé par du tissu adipeux et des cellules hématopoïétiques dans des proportions variables. La totalité de la surface osseuse est cellulaire. Les ostéoclastes multinucléés sont typiquement retrouvés dans des groupes juxtaposés l'un à l'autre. Les ostéoblastes sont aussi retrouvés en groupes avec les mêmes activités. L'os est imperméable et les cellules osseuses, particulièrement les ostéoclastes, sont délicates. Les interfaces physiologiques de l'os avec d'autres cellules ou fluides se font via les ostéoclastes et les ostéoblastes ; les exceptions sont les cas pathologiques de fractures ou de nécrose.

Les ostéoblastes deviennent emprisonnés dans l'os qu'ils produisent. Ces cellules restent vivantes et s'appellent maintenant des ostéocytes. Les ostéoblastes produisent

aussi d'autres protéines de la matrice, incluant l'ostéopontine qui lie les intégrines et l'ostéocalcine. Des protéines spécialisées de la matrice, les interleukines et des facteurs de croissance créés par les ostéoblastes affectent la structure osseuse et les interactions os-cellules de différentes façons (ROBEY, 1996; DUCY *et al.*, 1996). L'ostéoblaste a aussi une phase de quiescence où il n'y a pas de synthèse d'os. Les humains remplacent normalement l'os trabéculaire en 3 à 4 ans. Cependant, ce rythme est variable et souvent plus long, particulièrement lors du troisième âge. Puisque la formation et la dégradation sont (normalement) balancées, les ostéoclastes et les ostéoblastes agissent sur l'os approximativement au même rythme. L'os cortical, qui est dense et relativement inflexible, se renouvelle aussi. Toutefois, cela se produit habituellement moins d'une fois par décennie à partir du moment où le squelette atteint la taille adulte.

### **1.1.2 Ostéoclaste**

La caractérisation des ostéoclastes a été particulièrement difficile, car ce sont des cellules relativement rares qui couvrent moins de 1 % de la surface osseuse chez le jeune adulte et qui sont étroitement associées à la matrice minéralisée. Aucune population totalement pure d'ostéoclaste n'a pu être isolée à ce jour. Compte tenu de leur durée de vie très courte, environ 48 heures en culture, il est difficile d'en obtenir en nombre suffisant pour des analyses biochimiques et moléculaires. Néanmoins, des progrès considérables dans la connaissance des ostéoclastes ont été faits ces dernières années grâce au développement de systèmes de différenciation *in vitro*. Toutefois, leur ontogénie précise reste un sujet de controverse. Il est établi que les ostéoclastes multinucléés dérivent de la fusion de précurseurs mononucléés d'origine hématopoïétique (JOTEREAU *et al.*, 1978 ; PARDANAUD *et al.*, 1989). Cependant, selon les modèles

proposés, les précurseurs divergeraient plus ou moins tardivement au cours de la voie de différenciation myéloïde.

L'hématopoïèse regroupe un ensemble d'étapes permettant de distinguer, à partir d'une cellule souche multipotente, plusieurs précurseurs qui donneront ultérieurement les différents lignages hématopoïétiques. Chacune des étapes de leur programme de différenciation fait l'objet d'un contrôle précis, relayé par des facteurs de croissance spécifiques du lignage et du stade de différenciation.

La caractérisation des précurseurs hématopoïétiques a initialement été réalisée chez la souris à l'aide de techniques de culture *in vitro* en milieu semi-solide. Dans ce type de culture de tissu hématopoïétique, les précurseurs développent des colonies de cellules différenciées dont la composition indique la potentialité du précurseur dont elles dérivent. Différents précurseurs ont été identifiés selon le type de cellules qu'ils produisent en culture. Des colonies de macrophages dérivent de précurseurs unipotents, CFU-M (colony forming unit-macrophage), alors que des colonies de granulocytes dérivent de CFU-G (colony forming unit-granulocyte). Celles composées de granulocytes et de macrophages dérivent du précurseur commun aux deux lignées, appelé CFU-GM. Ces précurseurs n'ont pu être caractérisés que par l'identification de facteurs de croissance (CSF ou colony stimulating factor) qui favorisent leur développement en culture, respectivement le G-CSF (granulocyte), le M-CSF (macrophage) et le GM-CSF (granulocyte macrophage).

La voie de différenciation de la lignée monocyttaire est bien caractérisée *in vitro*. Parmi les précurseurs, la première cellule identifiée dans cette voie est la CFU-GEMM (colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megocaryocyte) qui est la

précurseure multipotente des érythrocytes, mégacaryocytes, monocytes et granulocytes. Cette cellule donnera la CFU-GM bipotente dont dérive la CFU-M, le premier précurseur restreint à la voie monocyttaire (COWLING *et al.*, 1992). Le facteur de croissance M-CSF stimule la différenciation de la CFU-M vers le monocyte puis le macrophage. *In vivo*, les monocytes quittent la moelle osseuse et migrent par la circulation sanguine dans différents tissus où ils deviennent les différents macrophages tissulaires (GORDIN, 1995).

## **1.2 Contrôle de l'ostéoclastogénèse**

### **1.2.1 Les ostéoclastes dérivent de précurseurs monocytaires, de monocytes ou de macrophages (figure 1)**

Les nombreuses similitudes entre les monocytes-macrophages et les ostéoclastes suggèrent une relation très étroite entre ces deux types cellulaires. Les monocytes-macrophages sont souvent mis en évidence à proximité des sites de résorption et ils partagent des caractéristiques communes avec les ostéoclastes, telles que la mobilité et la présence d'une membrane ondulante. Les macrophages, comme les ostéoclastes, sont des cellules phagocytaires qui possèdent de nombreux lysosomes et mitochondries. Certains macrophages sont aussi capables de résorber, en partie, la matrice osseuse *in vitro*. Par ailleurs, les monocytes présentent une réponse chimiotactique à certains composants de la matrice osseuse (MARKS *et al.*, 1988).

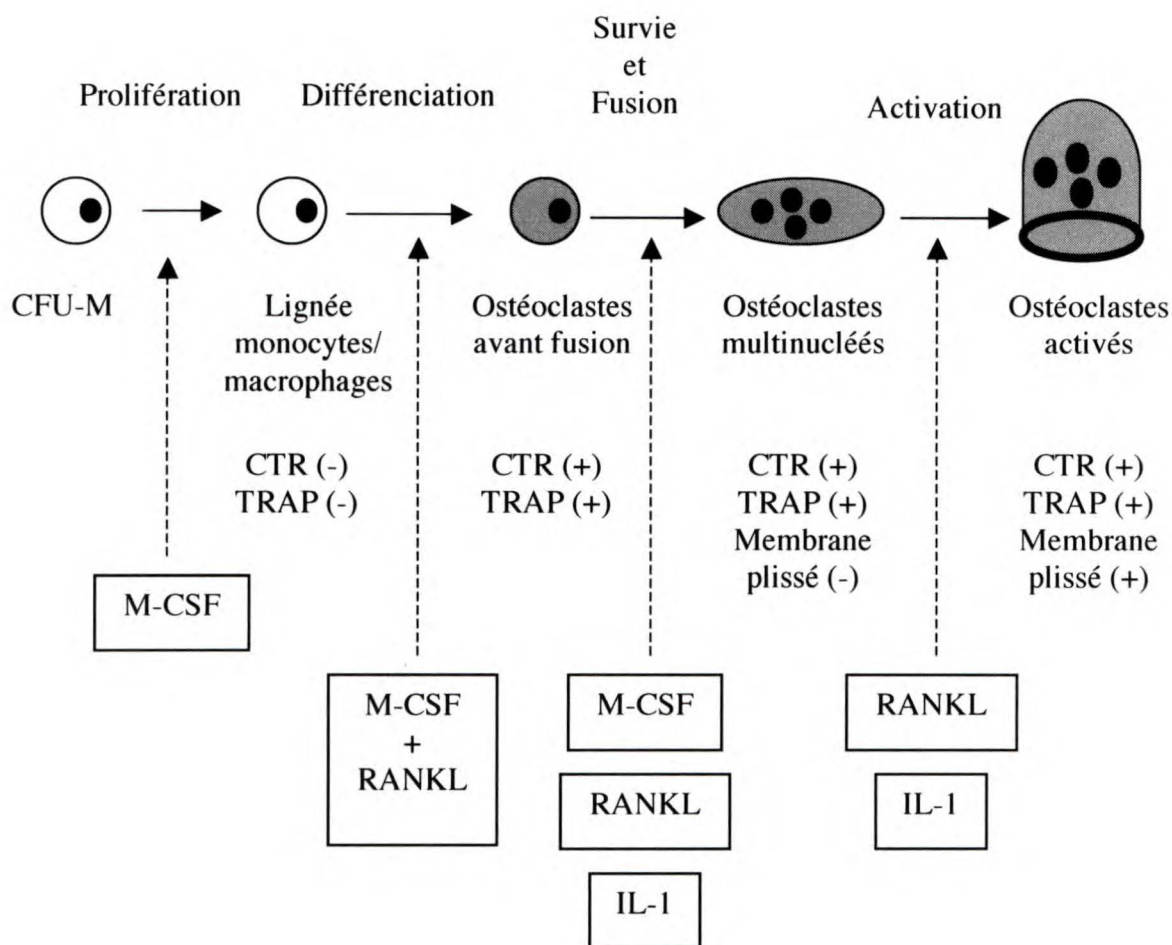


FIGURE 1 SCHÉMA DE L'OSTÉOCLASTOGÉNÈSE.

La voie de différenciation des précurseurs ostéoclastiques en des ostéoclastes matures capable de résorber l'os et les cytokines nécessaires pour chaque étape de la voie. L'effet de IL-1 peut être bloqué par des AINS.

Des antigènes communs entre les ostéoclastes et les monocytes-macrophages ont été mis en évidence chez différentes espèces, notamment chez l'homme, le lapin, le rat et le poulet (ATHANASOU *et al.*, 1990 ; ATHANASOU *et al.*, 1992 ; SIMINIA *et al.*, 1986).

TAKAHASHI *et al.* (1994) ont analysé, au cours du temps, dans des cocultures de cellules spléniques et ostéoblastiques murines, la synthèse de marqueurs spécifiques associés aux macrophages conduisant à la formation d'ostéoclastes fonctionnels. Leurs résultats mettent en évidence des cellules mononucléées présentant à la fois des caractéristiques des macrophages et des ostéoclastes. Ces cellules apparaissent après ajout d'hydroxyurée et de vitamine D<sub>3</sub>. Leur nombre diminue ensuite de façon corrélée à l'apparition d'ostéoclastes multinucléés. Ainsi, les précurseurs ostéoclastiques postmitotiques seraient des cellules mononucléées exprimant un phénotype macrophagique qui disparaîtrait au cours de leur différenciation en ostéoclastes.

Sur la base des similitudes antigéniques entre les monocytes-macrophages et les ostéoclastes, quelques auteurs ont testé l'hypothèse d'une filiation directe entre ces deux types cellulaires. Les arguments les plus décisifs ont été apportés par UDAGAWA *et al.* (1990) dont les travaux ont montré la formation d'ostéoclastes *in vitro* en présence de cellules stromales, de vitamine D<sub>3</sub> et de glucocorticoïde, et ce, non seulement à partir de cellules immatures de la lignée monocytes-macrophages, mais aussi à partir de monocytes circulants et de macrophages tissulaires. L'obtention d'ostéoclastes à partir de monocytes du sang de cordon ombilical a également été décrite chez l'homme (MBALAVIELE *et al.*, 1995). En outre, deux équipes ont démontré que des macrophages dérivés de monocytes de sang de poulet peuvent se différencier en cellules

géantes de type ostéoclaste (ALVAREZ *et al.*, 1992 ; WOODS *et al.*, 1995). Ces résultats montrent que les ostéoclastes peuvent être directement obtenus à partir de monocytes et de macrophages mûrs dans un micro-environnement approprié.

La capacité des macrophages de fusionner entre eux est connue depuis longtemps. En effet, la formation de macrophages polycaryoniques est observée dans des situations pathologiques. Elle est notamment associée à certaines réactions granulomateuses (tumeurs bénignes) induites par divers stimuli et fait partie intégrante de la réponse immunitaire de l'hôte dans les maladies infectieuses chroniques (parasitaires, virales, bactériennes et fongiques). Des granulomes contenant des macrophages polycaryoniques sont communément détectés dans des maladies idiopathiques comme la sarcoïdose, les maladies de Crohn et de Paget (CHAMBERS, 1978). Par ailleurs, des macrophages polycaryoniques qui dérivent des cellules de la microglie ont aussi été mis en évidence dans le cerveau de patients atteints du SIDA. Le processus d'activation des macrophages dans la réponse à l'inflammation, est associé à deux étapes essentielles : tout d'abord, la migration des cellules qui sont attirées par chimiotactisme jusqu'au site inflammatoire, puis leur fusion. Ces deux étapes rappellent le recrutement des précurseurs ostéoclastiques mononucléés à la surface de l'os qui vont ensuite fusionner pour remplir leur fonction.

Bien que le phénotype des macrophages polycaryoniques soit très semblable à celui des ostéoclastes, de nombreux auteurs considèrent néanmoins que les macrophages polycaryoniques n'ont aucun lien avec les ostéoclastes, car ils ne résorbent pas l'os, n'expriment pas de récepteurs de la calcitonine, n'expriment pas de phosphatase acide résistant aux tartrates et ne forment pas de membranes plissées. Cependant, des études



ont montré que les macrophages polycaryoniques sont responsables de l'ostéolyse maligne associée à certaines tumeurs et seraient donc capables de résorber la matrice osseuse (QUINN *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'induction d'une réaction inflammatoire par implantation intramusculaire de particules d'os chez les rats s'accompagne de la formation, à la surface de l'os, d'ostéoclastes présentant une membrane plissée et compétente pour la résorption (SAGINARIO *et al.*, 1995). Enfin, une autre équipe (VIGNERY *et al.*, 1991) a mis en évidence de nombreux récepteurs de la calcitonine fonctionnels à la surface de macrophages polycaryoniques dérivés de culture de macrophages alvéolaires de rats.

TONG *et al.* (1994) ont comparé le profil d'expression des gènes, entre des ostéoclastes obtenus à partir de culture de moelle osseuse de souris et des macrophages polycaryoniques dérivés de culture de cellules spléniques. Dans leurs conditions de culture, les macrophages polycaryoniques ne synthétisaient pas les ARNm codant pour la phosphatase TRAP, l'anhydrase carbonique II, le récepteur de la calcitonine et l'ostéopontine (une protéine de la matrice extracellulaire sécrétée notamment par l'ostéoclaste), et ce, contrairement aux ostéoclastes. Ces résultats apparaissent contradictoires avec ceux d'UDAGAWA *et al.* (1990) qui ont montré que les cellules multinucléées obtenues à partir de cellules spléniques synthétisent la phosphatase TRAP et le récepteur de la calcitonine. De plus, elles sont compétentes pour la résorption. Cependant, dans les expériences de TONG *et al.* (1994), les cellules spléniques ont été cultivées seules, alors que dans les expériences d'UDAGAWA *et al.* (1990), elles étaient cocultivées avec des ostéoblastes, en présence de  $1, 25 (OH)_2$  vitamines  $D_3$  et de dexaméthasone.

Baron et ses coéquipiers (BARON *et al.*, 1986) ont démontré, avec un système *in vivo* de différenciation ostéoclastique, que des cellules mononucléées qui s'attachent initialement à la surface de l'os possèdent une activité estérase non spécifique et, au cours de leur différenciation, se mettent à exprimer l'acide phosphatase résistante au tartrate, un marqueur enzymatique des ostéoclastes. Éventuellement, ces cellules perdent leur activité estérase non spécifique et forment des ostéoclastes multinucléés.

Similairement, BURGER *et al.* (1982) ont démontré que, lorsque des fragments d'os murin foetal sans ostéoclastes sont mis en coculture avec des caillots de plasma qui possèdent des cellules de moelle et une source de M-CSF, des ostéoclastes se forment.

### **1.2.2 Caractéristiques des précurseurs ostéoclastiques**

TAKAHASHI *et al.* (1994) ont démontré que les marqueurs les plus précoces des lignées ostéoclastes semblent être l'expression de la métalloprotéinase -9 (MMP-9), suivie par l'expression de la TRAP chez les cellules dérivées de la souche CFU-GM après traitement avec 1, 25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. LEE *et al.* (1995) et WADA *et al.* (1995), par l'intermédiaire de culture de moelle murine, ont rapporté que des cellules mononucléées TRAP positives se forment initialement dans ces cultures et par la suite, acquièrent l'expression du récepteur à la calcitonine après plusieurs jours de traitement avec 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>.

WESOLOWSKI *et al.* (1995) ont rapporté l'isolation et la caractérisation de cellules précurseurs d'ostéoclastes en préfusion. Ces cellules étaient mononucléées et exprimaient le récepteur à la calcitonine ainsi que les ARNm de MMP-9, anhydrase carbonique II, et haut niveaux de la protéine pp60c-src. Les précurseurs pouvaient résorber de l'os seulement en présence de 1, 25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> et en coculture

avec une lignée ostéoblastique. Tous ces travaux suggèrent que les précurseurs ostéoclastiques expriment TRAP et MMP-9 et proviennent de la souche CFU-GM.

Des précurseurs de la famille des monocytes-macrophages sont requis pour produire des ostéoclastes (FUJIKAWA *et al.*, 1996). Dans la plupart des circonstances, une différenciation efficace nécessite le contact de cellules stromales (JIMI *et al.*, 1996). Cependant, des cellules exprimant la phosphatase acide résistantes aux tartrates ont été produites directement de macrophages avec un cocktail incluant l'interleukin-1 (IL-1), IL-3 et le facteur stimulant de colonie-1 (CSF-1) (MATAYOSHI *et al.*, 1996). Ces résultats apparemment disparates peuvent simplement indiquer plusieurs voies métaboliques pour la formation des ostéoclastes. Dans la plupart des cas, le renouvellement osseux remplace l'os vivant de façon ordonnée. Des signaux des ostéoblastes ne seraient donc pas surprenants. Par contre, dans le cas des fractures ou de l'os nécrotique, où il n'y a pas d'ostéoblastes ou de cellules stromales, les ostéoclastes se forment et dégradent l'os mort. Alors, nous pouvons anticiper que de tels mécanismes alternatifs pour la formation d'ostéoclastes existent et entreraient en action lors de circonstances où les ostéoblastes et les autres cellules de la matrice sont absents.

Les macrophages sont des cellules avec des adaptations particulières pour la dégradation acide, et les minéraux de l'os sont solubles dans l'acide. Alors, il est logique que les ostéoclastes soient apparentés aux macrophages. La différenciation des ostéoclastes des précurseurs circulant (KAHN et SIMMONS, 1975) de la famille des monocytes-macrophages (KAHN *et al.*, 1978; FUJIKAWA *et al.*, 1996) a été démontrée conclusivement.

Les cellules précurseurs monocytes-macrophages sont essentielles pour la formation d'ostéoclastes. Alors, les facteurs importants au développement des macrophages comme le CSF-1 (ligand du c-fms) sont aussi requis pour la différenciation des ostéoclastes (SUDA *et al.*, 1997a). Cependant, les facteurs sont impliqués dans des étapes de différenciation qui ne sont pas des sites majeurs de contrôle pour le catabolisme osseux puisqu'ils sont aussi requis pour la production de macrophages. Les autres signaux nécessaires pour la différenciation des ostéoclastes incluent le stéroïde 1, 25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. Cette hormone systémique a des effets majeurs sur le cartilage, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les organes. L'hormone parathyroïdienne a un effet dramatique de suractivation de l'activité ostéoblastique et la formation d'ostéoclastes, quoique les ostéoblastes peuvent se former en son absence. Comment les signaux de la vitamine D<sub>3</sub> et de l'hormone parathyroïdienne influencent le développement et le contrôle des ostéoclastes nécessite encore beaucoup plus d'étude. Il est possible que certains de ces effets soient régis par les ostéoblastes et les chondrocytes plutôt que directement sur les ostéoclastes. Cependant, les ostéoclastes se forment sans la présence des autres cellules de l'os. La découverte que des anticorps à CD98 induisent la formation d'ostéoclastes directement (HIGUCHI *et al.*, 1998) est particulièrement excitante puisque ceci suggère un simple mécanisme qui pourrait être un facteur commun aux voies de différenciation des ostéoclastes.

Bref, l'expression du phénotype ostéoclastique *in vitro* dépend des conditions de culture plutôt que de l'origine des macrophages polycaryoniques. De plus, les ostéoclastes correspondraient au même type cellulaire que des macrophages polycaryoniques, mais à des étapes de maturation différentes.

La formation des macrophages polycaryoniques a d'abord été associée aux réactions inflammatoires chroniques et aux tumeurs, alors que les ostéoclastes se différencient sur l'os qu'ils résorbent. La littérature rapportée ci-dessus suggère que ces deux types cellulaires sont très proches et que la spécialisation de leur fonction dépend essentiellement de leur environnement.

L'hypothèse que l'expression de facteurs de croissance spécialisés locaux est importante lors de la différenciation terminale des ostéoclastes est un sujet fortement investigué. Les candidats incluent le facteur de croissance des hépatocytes et le facteur des cellules pluripotentes (GRANO *et al.*, 1996; GATTEI *et al.*, 1996; van'T HOF *et al.*, 1997a). D'autres facteurs qui affectent la différenciation des ostéoclastes et leurs activités incluent la prostaglandine E<sub>2</sub> et des interleukines telles que IL-1 et IL-6 (SUDA *et al.*, 1997a). Ces facteurs ont été le sujet de plusieurs études et ne sont probablement pas à eux seuls responsables de l'étape clé de transformation de préostéoclastes en ostéoclastes. Il est possible que plusieurs facteurs soient requis dans les dernières étapes de la formation d'ostéoclastes. Chez les ostéoclastes, la différenciation implique des éléments tels que c-Fos et PU.1 (GRIGORIADIS *et al.*, 1994; TONDRAVI *et al.*, 1997). Les facteurs de transcription associés à la différenciation sont des outils prometteurs pour la détermination plus complète des voies de différenciation des ostéoclastes. Par contre, il est difficile de séparer le contrôle de la différenciation et la modulation de l'activité des ostéoclastes matures.

### **1.2.3 Systèmes *in vitro* de différenciation des ostéoclastes**

Les principaux critères utilisés pour l'identification des ostéoclastes sont fondés sur : leur morphologie, l'expression de certains marqueurs tels que la phosphatase acide

résistante au tartrate (TRAP), les récepteurs de la calcitonine (CTR), l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  le récepteur de la vitronectine et l'anhydrase carbonique II (CAII). Enfin, la capacité des ostéoclastes de résorber des fragments d'os *in vitro* est le critère d'identification fonctionnel.

Durant ces dernières années, plusieurs approches ont été développées pour déterminer l'origine cellulaire précise des ostéoclastes ainsi que le micro-environnement optimal pour induire leur différenciation terminale en cellules fonctionnelles résorbant l'os. Dans ce but, de nombreux modèles ont été décrits dans lesquels des populations cellulaires contenant les précurseurs potentiels des ostéoclastes ont été cultivés sur plusieurs substrats. La plupart des modèles cellulaires récents utilisent la coculture de cellules stromales de type ostéoblaste en présence de  $\alpha 1, 25$  dihydroxyvitamines  $D_3$ , hormone de différenciation ostéoclastique. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir des ostéoclastes résorbant l'os.

#### **1.2.4 Rôle du micro-environnement de l'os sur la formation d'ostéoclastes**

UDAGAWA *et al.* (1989) et TAKAHASHI *et al.* (1988) ont publié que la coculture de cellules de la rate ou de la moelle comme source de précurseurs ostéoclastiques avec des cellules stromales ou des ostéoblastes induit la formation d'ostéoclastes. Les cellules stromales ou les ostéoblastes qui induisent la formation d'ostéoclastes doivent produire du M-CSF puisque les cellules stromales de la moelle ou les ostéoblastes de souris *op/op*, qui sont incapables de produire du M-CSF, ne soutiennent pas la formation d'ostéoclastes (KODAMA *et al.*, 1991). Le M-CSF soluble étant insuffisant à lui seul pour remplacer les cellules stromales de la moelle dans ce système de coculture suggère que d'autres facteurs produits par les cellules stromales de

la moelle ou des ostéoblastes sont indispensables pour le développement d'ostéoclastes à partir des précurseurs.

Récemment, un nouveau facteur produit par les cellules stromales de la moelle et des ostéoblastes a été identifié comme étant critique à la formation d'ostéoclastes. Par ailleurs, ce facteur est capable de remplacer les cellules stromales dans les systèmes de coculture pour induire la formation d'ostéoclastes par les cellules de la rate. Ce facteur, receptor activator NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), est un nouveau membre de la famille des TNF (LACEY *et al.*, 1998; YASUDA *et al.*, 1998a). Il possède plusieurs alias TRANCE, osteoclast differentiation inducing factor (ODF) et ostéoprotégérine ligand (OPGL). RANKL active la kinase c-Jun et envoie le signal au NF- $\kappa$ B. YASUDA *et al.* (1998a) et une autre équipe (HOFBAUER et HEUFELDER, 1998) ont démontré que la plupart des facteurs ostéotropiques qui induisent la formation d'ostéoclastes agissent indirectement par la voie des cellules stromales de la moelle et induisent l'expression du RANKL. Le RANKL lie à son récepteur RANK sur les précurseurs ostéoclastiques et induit la formation d'ostéoclastes. Une forme soluble de RANKL a été synthétisée. Lorsqu'elle est ajoutée à une culture de cellules de la rate ou CFU-GM dans la présence de M-CSF et de dexaméthasone, on observe une énorme augmentation de la formation d'ostéoclastes. De plus, l'importance du RANKL a été démontrée par recombinaison homologue où l'absence du RANKL chez la souris amène une ostéopétrose sévère et l'absence d'ostéoclastes (TSUKII *et al.*, 1998). Similairement, la surexpression du RANKL chez les souris transgéniques induit une ostéoporose sévère. L'activité du RANKL peut être bloquée par un récepteur soluble l'ostéoprotégérine (OPG). L'OPG, qui porte aussi le nom facteur d'inhibition de l'ostéoclastogénèse, est un membre de la superfamille des

récepteurs du TNF (SIMONET *et al.*, 1997; YASUDA *et al.*, 1998b). *In vivo* comme *in vitro*, l'ostéoclastogénèse est bloquée de façon dose dépendante par l'OPG recombinante. L'OPG est produite par la plupart des types cellulaires et semble bloquer la fusion/différenciation lors de l'ostéoclastogénèse plutôt que lors de la phase de prolifération. L'OPG se lie à un seul site de haute affinité sur les cellules ST2 (cellules stromales de la moelle) traitées avec la 1,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. L'équipe de YASUDA *et al.*(1998) a démontré que RANKL produit par les ostéoblastes, s'attache à l'OPG et bloque l'effet inhibiteur de l'OPG sur l'ostéoclastogénèse (figure 2).

Deux compagnies AMGEN et SNOW BRAND MILK ont démontré que la surexpression de l'OPG chez des souris transgéniques amène une ostéopétrose sévère, alors que l'absence de l'OPG induit une ostéopénie (MIZUNO *et al.*, 1998). Alors, RANKL et OPG sont d'importants régulateurs de l'ostéoclastogénèse produite par le micro-environnement de la moelle osseuse et de l'os.



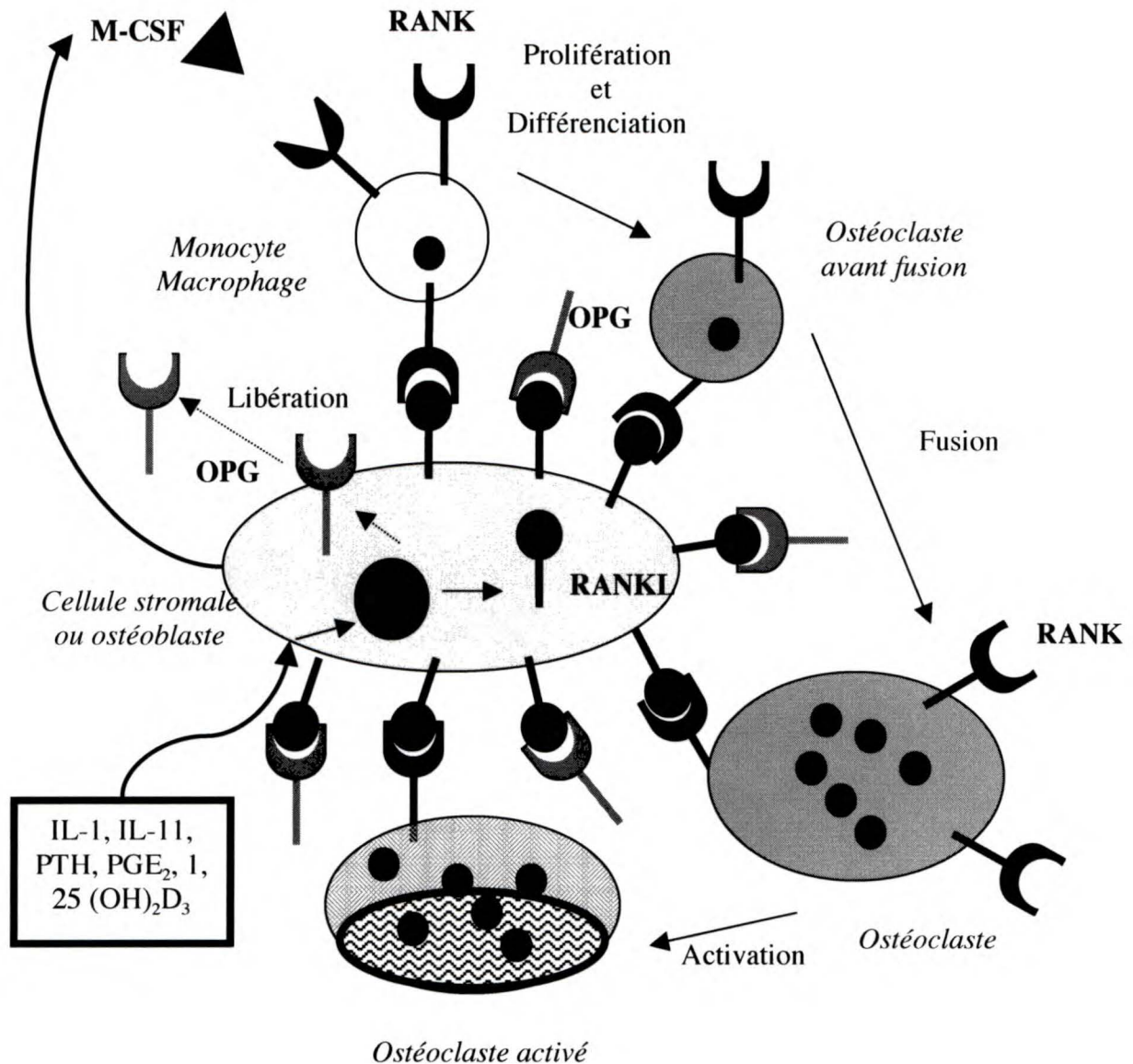


FIGURE 2 SCHÉMA DE LA DIFFÉRENTIATION ET DE LA FONCTION DES OSTÉOCLASTES AVEC LE SUPPORT DES OSTÉOBLASTES OU DES CELLULES STROMALES

Les agents suivants sont nécessaires pour la stimulation des ostéoblastes ou des cellules stromales pour activer la voie de différenciation des précurseurs ostéoclastiques en des ostéoclastes matures capables de résorber l'os. L'effet de IL-1 peut être bloqué par des AINS.

### **1.3 Mécanismes de la dégradation osseuse**

Les mécanismes du renouvellement osseux ont été étudiés intensément pendant des décennies. Ces études étaient motivées par des intérêts généraux de connaissance de ce processus biologique fondamental et par l'importance pratique dans des pathologies comme l'ostéoporose, dont souffre un très grand nombre d'individus. Les premiers essais pour comprendre les mécanismes cellulaires du renouvellement de l'os étaient descriptifs. Cela a d'ailleurs amené des interprétations controversées. Cependant, il est très important de rappeler que les observations significatives incluent des études avec des teints vitaux, suggérant des conditions acides au niveau du site de résorption sur l'os (BARNICOT, 1947; CRETIN, 1951). D'autre part, des études des ostéoclastes avec le microscope à électrons suggèrent une structure spécialisée d'attachement de l'ostéoclaste à l'os et un transport vacuolaire d'os dégradé à l'intérieur des ostéoclastes (HOLTROP et KING, 1977). Les avancements dans la biologie cellulaire et la biochimie ont permis des études plus détaillées de la dégradation osseuse dans les dernières décennies. Ces études, facilitées par des méthodes d'isolation des ostéoclastes (ZAMBONIN ZALLONE *et al.*, 1982; CHAMBERS *et al.*, 1984) ont donné un aperçu très compréhensif de la physiologie de cette cellule, incluant son attachement à l'os, les voies biochimiques de la dégradation de la matrice, et l'enlèvement des produits dégradés.

#### **1.3.1 Fusion cellulaire**

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées postmitotiques. La régulation de leur différenciation représente donc un mécanisme important pour leur renouvellement et

le maintien du processus de résorption. La différenciation des ostéoclastes implique la fusion de cellules chez tous les vertébrés qui produisent des ostéoclastes.

La fusion cellulaire augmente l'aire qui est en contact avec l'os relativement à la circonférence de l'attachement cellule-os, qui doit être étanche pour produire l'environnement acide, un avantage pour le maintien du gradient de pH utilisé pour la dissolution de l'os. Les ostéoclastes possèdent de 3-5 à 12-15 nucléoles dépendant des espèces. Dans une même espèce, le nombre de nucléoles par cellule peut varier avec l'activité du renouvellement de l'os (LEES *et al.*, 2001; RIES *et al.*, 1987; BARON *et al.*, 1986; ROWE et HAUSMANN, 1977). Les mitochondries sont abondantes chez les ostéoclastes, ce qui démontre la demande importante d'énergie pour dissoudre de l'os. Les ostéoclastes actifs ont à leurs interfaces avec l'os une membrane plasmique hautement plissée avec une grande surface d'exposition. Cette membrane plissée supporte les appareils pour le transport massif de HCl. De plus, les ostéoclastes possèdent plusieurs sortes de vacuoles qui participent aux processus de sécrétion et de transport.

### **1.3.2 Attachement de l'ostéoclaste à l'os**

Maintenant que l'on comprend que les ostéoclastes sécrètent d'énormes quantités d'acide dans un compartiment extracellulaire, le mécanisme d'attachement des ostéoclastes est devenu un site de recherche de grand d'intérêt. L'identification des effets d'antagonistes qui bloquent la liaison des récepteurs arginyl-glycyl-glutamyl (FISHER *et al.*, 1993) et par après la démonstration du récepteur  $\alpha_v\beta_3$  intégrine comme élément clé (ROSS *et al.*, 1993) ont été des avancements très importants. La découverte que l'anticorps anti- $\beta_3$  intégrine, à lui seul, était suffisant pour interrompre l'action

ostéoclastique *in vivo* (CRIPPES *et al.*, 1996) présente de fortes évidences que ce mécanisme particulier est requis pour l'attachement des ostéoclastes dans des conditions physiologiques. Plusieurs observations au sujet de l'attachement des ostéoclastes indiquent que ceci est un processus complexe qui implique des signaux intracellulaires ainsi que des récepteurs autres que le  $\alpha_v\beta_3$  intégrine (COLUCCI *et al.*, 1993). Les domaines où des clarifications seraient utiles incluent l'organisation du cytosquelette de l'ostéoclaste (qui possède une architecture spéciale lors de l'attachement à l'os) (HOLTROP et KING, 1977; TETI *et al.*, 1992), l'occurrence et la fonction des protéines autres que les intégrines qui sont associées à la membrane et les rôles physiologiques des nombreux processus de signalisation intracellulaire qui pourraient être reliés à l'attachement.

### **1.3.3 Ostéoclastes matures et activités**

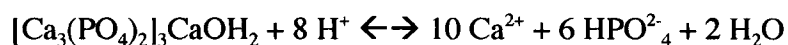
Les ostéoclastes sont caractérisés par l'expression de  $H^+$ -ATPase vacuolaire à la surface cellulaire (BLAIR *et al.*, 1989) et par l'expression de protéines qui produisent l'acide qui dissout les minéraux de l'os et qui secrètent la phosphatase acide résistante aux tartrates caractéristiques (EK-RYLANDER *et al.*, 1991).

#### **1.3.3.1 Sécrétion acide**

L'activité principale de l'ostéoclaste est la sécrétion acide. Celle-ci est accomplie par la forte expression de l'ATPase vacuolaire type V électrogénique (BLAIR *et al.*, 1989). L'ostéoclaste modifie l'expression de cette pompe durant son cycle de résorption alors que la distribution de la pompe contrôle son activité (van HILL *et al.*, 1993; LAITALA-LEINONEN *et al.*, 1996). Chez un type de souris ostéopérotique (oc/oc), de

hauts niveaux d'expression de la pompe à proton sont présents. Par contre, l'habilité de la pompe à cibler la membrane plasmique est perdue. L'hypothèse est que ce phénomène a un lien avec la perte de l'association d'une sous-unité de la pompe au cytosquelette (NAKAMURA *et al.*, 1997).

Le transport acide des ostéoclastes dépose de l'acide sur les minéraux fortement basiques,  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{CaOH}_2$ , de façon à ce que le processus déplace des concentrations molaires d'acide pour libérer le calcium plutôt que des concentrations millimolaires pour acidifier les espaces attachés à la membrane comme dans les autres cellules :



Plusieurs centaines de milligrammes de calcium sont déposés et enlevés du squelette humain à tous les jours. Cela signifie qu'une grande quantité d'acide doit être transportée et que l'expression ostéoclastique de la V-ATPase est massive. L'activité de la ATPase est de toute évidence un processus qui nécessite beaucoup d'énergie, c'est pourquoi les ostéoclastes sont remplis de mitochondries. La source d'énergie pour la sécrétion d'acide semble être exclusivement le glucose (WILLIAM *et al.*, 1997). Puisque la  $\text{H}^+$ -ATPase est une pompe électrogénique qui transporte seulement des protons, il doit donc y avoir un autre processus de transport pour balancer les charges. Un canal du chlorure stilbène-sensible de 60 kDa et exprimé dans la même membrane assure cet équilibre (BLAIR *et al.*, 1991; SCHLESINGER *et al.*, 1997). La source des protons pour la sécrétion d'acide est l'acide carbonique. Sa génération lente et spontanée à partir du  $\text{CO}_2$  produit par la phosphorylation oxydative est augmentée par l'expression de l'anhydrase carbonique de type II chez les ostéoclastes (HUNTER *et al.*, 1991; SLY, 1991). Puisque la sécrétion de  $\text{H}^+$  laisse la base dans la cellule, la sécrétion massive de HCl doit obligatoirement

nécessiter une sécrétion d'une base tampon pour maintenir le pH intracellulaire de l'ostéoclaste dans les limites physiologiques. Ceci est accompli par un échange passif du bicarbonate-chlorure dans la membrane basolatérale (TETI *et al.*, 1989; BASTANI *et al.*, 1996). Le tout permet une sécrétion acide balancée poussée par un seul processus actif, le H<sup>+</sup>-ATPase.

### 1.3.3.2 Dégradation enzymatique de la matrice organique

La dégradation de la matrice de l'os est un sujet très controversé. Plusieurs études ont identifié des enzymes *in situ* en plus de la purification de métalloprotéinases et de thiol protéinases de l'os. Il est donc fort probable que ce mécanisme nécessite plusieurs enzymes. Cependant, une découverte majeure dans ce domaine est le résultat de l'analyse de librairie ADNc des ostéoclastes de mammifères : la découverte d'une nouvelle thiol protéinase (TEZUKA *et al.*, 1994; INAOKA *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995), la cathepsine K, qui est exprimée de façon proéminente (BOSSARD *et al.*, 1996). De toute évidence, cette voie de la recherche a rapidement identifié le déficit d'expression de la cathepsine K comme étant la cause du pycnodysostose, la maladie de Toulouse-Lautrec (GELB *et al.*, 1996). La cathepsine K est la protéinase prédominante dans les ostéoclastes humains (DRAKE *et al.*, 1996). Les anomalies chez les individus atteints de la pycnodysostose, une petite stature et l'ostéosclérose, constitue une forme d'ostéopétrose compatible avec la vie. Cela nous démontre le rôle important, mais non exclusif, de la cathepsine K dans le renouvellement de l'os. Les protéinases acides, incluant l'aspartate protéinase cathepsine D et les thiols protéinases cathepsines B et L qui sont aussi présentes dans les ostéoclastes (DELAISSÉ *et al.*, 1991; BLAIR *et al.*, 1993; GOTO *et al.*, 1993), pourraient être importantes dans la pycnodysostose, ayant un

rôle secondaire dans la dégradation de la matrice osseuse normale. De plus, les métalloprotéinases qui ont été identifiées dans l'os (DELAISSÉ *et al.*, 1993; WUCHERPFENNIG *et al.*, 1994; HOLLIDAY *et al.*, 1997; SATO *et al.*, 1998) pourraient bien être importantes dans la dissolution de la matrice non minéralisée pour permettre à l'ostéoclaste de former la liaison étanche pour l'acidification extracellulaire.

#### **1.4 Contrôle de l'activité ostéoclastique implique plusieurs voies**

Les diverses forces qui poussent la dégradation et la formation des os sont balancées par des mécanismes de contrôle complexes (MANOLAGAS et JILKA, 1995). Chez l'humain adulte, l'homéostasie du calcium et la réparation de l'usage sont généralement les facteurs majeurs qui influencent le renouvellement de l'os, quoique la perte osseuse à long terme soit aussi liée au processus incluant l'utilisation du squelette pour balancer des charges d'acide chronique (SEBASTIEN *et al.*, 1994). Si la structure de l'os est perdue (ostéoporose), l'échec structural arrive éventuellement. La force de l'os est aussi compromise lorsque le renouvellement osseux est interrompu pour une période prolongée, même si la masse osseuse de l'ensemble reste adéquate. Ce sont les processus de contrôle qui régularisent la différenciation ostéoclastique et l'activité ostéoclastique qui posent les épreuves les plus difficiles à surmonter dans la biologie des ostéoclastes. Les mécanismes physiologiques de base de la fonction des ostéoclastes sont bien décrits, quoique quelques processus fonctionnellement importants manquent toujours de détail. Les mécanismes de la régulation du renouvellement osseux sont moins bien établis. Puisque l'ostéoclaste participe au développement et la croissance de l'os, le renouvellement et la réponse à la charge, l'homéostasie des électrolytes, ainsi que

le processus de la réparation, il est fort probable que plusieurs voies métaboliques contrôlent l'ostéoclastogénèse et la régulation des ostéoclastes matures.

#### **1.4.1 Prostaglandines et os**

Les prostaglandines sont de puissants et multifonctionnels régulateurs du métabolisme osseux qui possèdent des effets stimulateurs ainsi qu'inhibiteurs (KAWAGUCHI *et al.*, 1996; PILBEAM *et al.*, 1996). De plus, le tissu squelettique est une source abondante de production de prostaglandines. C'est pourquoi les prostaglandines endogènes ont probablement un rôle important dans la physiologie et la pathophysiologie de l'os. Les études récentes suggèrent qu'il existe plusieurs voies et récepteurs pour les réponses des prostaglandines dans le tissu osseux.

##### **1.4.1.1 Prostaglandines et résorption osseuse**

Les prostaglandines stimulent la résorption osseuse en augmentant le nombre et l'activité des ostéoclastes. La  $\text{PGE}_2$  est l'agoniste le plus puissant, quoique d'autres prostanoïdes, particulièrement la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) sont des stimulateurs puissants. Les prostaglandines semblent avoir un rôle critique dans le développement des cellules avec le phénotype d'ostéoclaste dans les cultures de moelle osseuse. L'habilité de plusieurs stimulateurs à induire l'expression de TRAP dans de tels systèmes de culture peut être bloquée par l'inhibition de production des prostaglandines (TAI *et al.*, 1997; HURLEY *et al.*, 1998; LADER et FLANAGAN, 1998; QUINN *et al.*, 1997). Par contre, la fonction d'ostéoclastes matures est inhibée par les prostaglandines (LADER et FLANAGAN, 1998).



La plupart des stimulateurs puissants de la résorption osseuse augmentent la production de prostaglandines dans l'os par l'induction de la COX-2, quoiqu'ils stimulent la résorption par des voies indépendantes des prostaglandines (KAWAGUCHI *et al.*, 1996; TAI *et al.*, 1997; MIN *et al.*, 1998). La disruption du gène de la COX-2 amène une diminution remarquable de l'ostéoclastogénèse (RAISZ, 1999).

La stimulation ainsi que l'inhibition de la résorption osseuse par les prostaglandines peuvent être copiées par des analogues des AMP cycliques. Il y a deux récepteurs à la PGE<sub>2</sub> chez les cellules osseuses qui peuvent augmenter l'AMP cyclique, les récepteurs EP2 et EP4. Le récepteur EP4 est probablement important dans la stimulation de la résorption osseuse puisque son antagoniste AH23848B bloque la formation d'ostéoclastes induite par la PGE<sub>2</sub> (ONO *et al.*, 1998).

#### **1.4.1.2 Prostaglandines et formation osseuse**

Les prostaglandines peuvent stimuler la formation osseuse en augmentant la réplication et la différenciation des ostéoblastes (WOODIEL *et al.*, 1996). Cet effet est associé à une augmentation dans la production des facteurs de croissance. Il y a des preuves indirectes que la stimulation de la formation de l'os est contrôlée par le récepteur EP2, qui est exprimé chez les précurseurs ostéoblastiques (WOODIEL *et al.*, 1996; NEMOTO *et al.*, 1997).

Une fois que l'ostéoblaste est complètement différencié, de hautes concentrations de prostaglandines peuvent inhiber la synthèse de collagène. Cet effet inhibiteur a la participation d'un récepteur sélectif pour les prostaglandines de la série F. Ceci a d'ailleurs été démontré chez les ostéoblastes différenciés (FALL *et al.*, 1994; NEMOTO *et al.*, 1995).

L'effet inhibiteur de IL-1 sur la transcription du gène de collagène *in vivo* implique des prostaglandines endogènes (HARRISON *et al.*, 1998). Avec les cultures de cellules stromales de moelle, la dexaméthasone peut inhiber et les prostaglandines peuvent stimuler la formation de colonies d'ostéoblastes (SCUTT *et al.*, 1996). Finalement, le rôle des prostaglandines endogènes dans la formation de l'os dépend probablement du site et du type de cellules productrices des prostaglandines dans le squelette.

#### **1.4.2 Rôles physiologiques des prostaglandines dans l'os**

Basé sur leurs effets et leur production abondante dans les tissus squelettiques, il est très probable que les prostaglandines soient importantes dans la régulation du renouvellement de l'os. Un des rôles physiologiques probables des prostaglandines est de contrôler la réponse aux forces mécaniques. La stimulation de la formation osseuse induite par la charge est bloquée par les AINS (CHOW et CHAMBERS, 1994). Une augmentation dans la production des prostaglandines lors de la soumissions à des charges de poids a été démontrée chez les humains (THORSEN *et al.*, 1996). La force de cisaillement du fluide, qui augmente durant le chargement mécanique peut induire la COX-2 (KLEIN-NULEND *et al.*, 1997). L'habilité des signaux faibles des ostéocytes à altérer la fonction des cellules osseuses est peut-être dépendante de l'habilité des prostaglandines à autoamplifier leur production en induisant davantage la COX-2 (PILBEAM *et al.*, 1995).

### 1.4.3 Rôles pathophysiologiques

La première indication que les prostaglandines endogènes jouent probablement un rôle pathophysiologique se trouve dans les modèles animaux d'hypercalcémie maligne. Cependant, ce mécanisme est peu commun chez les humains (WALTHER *et al.*, 1997). Un rôle plus important pour les prostaglandines endogènes a été postulé pour la perte osseuse lors de maladies inflammatoires, incluant la perte osseuse périarticulaire lors de l'arthrite inflammatoire et la perte osseuse alvéolaire associée à la périodontite (JEFFCOAT *et al.*, 1995). Un rôle pour les prostaglandines endogènes dans la formation osseuse pathologique est supporté par des études démontrant que l'ossification hétérotropique après une intervention orthopédique peut être fortement diminuée avec une thérapie d'AINS (KJAERGAARDSEN *et al.*, 1993).

Un autre rôle des prostaglandines endogènes est lié à la pathogenèse de l'ostéoporose. Cela est supporté par des études dans les modèles animaux. Le surnageant de la moelle chez les souris ayant eu une ovariectomie stimule la résorption osseuse dans les cultures de fragments du crâne de souris par un mécanisme dépendant des prostaglandines, impliquant l'induction de la COX-2 (KAWAGUCHI *et al.*, 1995). L'utilisation continue de l'aspirine est associée à une masse osseuse un peu plus élevée, mais sans différence sur le taux de fractures (BAUER *et al.*, 1996). Un autre désordre étrange qui peut impliquer les prostaglandines endogènes est la maladie de Caffey's. Cette maladie de la nouvelle formation d'os aux périostes est simulée chez les enfants néonatales à qui on donne des infusions de prostaglandines pour maintenir en fonction le ductus arteriosus. Cette maladie peut être traitée avec des AINS (THOMETZ et DIRAIMONDO, 1996).

Le squelette est clairement une cible majeure pour les prostaglandines. Cependant, à cause de la complexité des réponses dans les cellules osseuses, il est difficile d'identifier précisément les rôles physiologiques et pathologiques des prostaglandines. La possibilité de nouvelles thérapies avec les AINS inhibiteurs sélectifs des COX-2 pour la perte de masse osseuse est définitivement une voie de recherche valable. Les récentes évidences que les différents récepteurs peuvent contrôler la stimulation de la résorption osseuse et de la formation osseuse par les prostaglandines promettent la recherche et le développement de nouveaux agonistes et antagonistes pour ces récepteurs. Avec les méthodes de biologie moléculaire et de modelage moléculaire, on devrait identifier, dans le squelette, des sites ou des voies métaboliques pour la production des prostaglandines et leurs réponses ainsi que l'habilité de manipuler ces réponses de façon à améliorer le contrôle des désordres squelettiques.

Les études *in vivo* chez les animaux et les humains suggèrent que les prostaglandines sont responsables pour l'hypercalcémie maligne ainsi que la perte osseuse inflammatoire lors de la périodontite et l'arthrite rhumatoïde. Les prostaglandines sont de puissants agonistes qui peuvent stimuler et inhiber la résorption et la formation osseuse. Lors des expériences *in vivo*, l'effet majeur des prostaglandines exogènes, particulièrement la PGE<sub>2</sub>, est de stimuler la résorption et la formation de l'os. Ces effets semblent impliquer la prolifération et la différenciation de précurseurs ostéoclastiques et ostéoblastiques (KAWAGUCHI *et al.*, 1995).

Les études sur l'induction de la COX-2 ont été faites pour la plupart *in vitro* avec des cellules en culture. IL-1 est bien connu comme étant un puissant activateur de la résorption osseuse *in vivo* et *in vitro*. Les ostéoblastes humains en culture n'expriment

pas l'ARNm de la COX-1 ou de la COX-2. Cependant, l'IL-1 induit l'expression de l'ARNm de la COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub>, le TNF $\alpha$  étant moins puissant (DE BRUM-FERNANDES *et al.*, 1994).

Les stress mécaniques produisent un déplacement de fluides dans le réseau d'ostéocytes lacunaires canaliculaires. Le déplacement des fluides à l'aide des pulsations induit l'expression de l'ARNm de la COX-2 (60 min), mais pas de la COX-1 et génère la production de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (5-10 min), de PGE<sub>2</sub> (10 min) et du 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (30-60 min) (KLEIN-NULEND *et al.*, 1997).

L'induction transcriptionnelle de l'ARNm de la COX-2 a été améliorée chez les MC3T3-E1 (une lignée ostéoblastique immortalisée) par la PGE<sub>2</sub> générée, suggérant le phénomène d'autoamplification (PILBEAM *et al.*, 1993), chez le rat avec les cellules ostéoblastiques Pyla (PILBEAM *et al.*, 1995) et chez les cellules humaines d'un ostéosarcome (WONG *et al.*, 1997). Le sous-type de récepteur à la PGE<sub>2</sub> pour la régulation autocrine a été reporté comme étant le EP1 (SUDA *et al.*, 1998).

En relation avec l'ostéoporose chez les femmes postménopausées, il a été démontré que les facteurs de la moelle osseuse peuvent augmenter la production de prostaglandines par la stimulation de l'expression de la COX-2 et que l'activité de ces facteurs était augmentée par l'ovariectomie et diminuée par les estrogènes (KAWAGUCHI *et al.*, 1995).

Les effets des prostaglandines sur la formation des ostéoclastes et sur la résorption osseuse sont probablement dépendants de la dose administrée et du système utilisé. Les prostaglandines sont des stimulateurs de la résorption osseuse dans les systèmes de culture d'os complet et pour la formation d'ostéoclastes dans le système de culture de

moelle de murin (TAKAHASHI *et al.*, 1988). Par contre, la prostaglandine PGE<sub>2</sub> inhibe la résorption osseuse ostéoclastique et la formation d'ostéoclastes dans les systèmes de moelle humaine (CHENU *et al.*, 1990). L'équipe de QUINN *et al.* (1997) a examiné l'effet de la PGE<sub>2</sub> sur l'ostéoclastogénèse. Pour identifier le mécanisme cellulaire responsable de l'effet inhibiteur de la PGE<sub>2</sub> et pour déterminer si l'inhibition par la PGE<sub>2</sub> était dépendante des cellules stromales qui supportent l'ostéoclastogénèse, la PGE<sub>2</sub> a été ajoutée à une coculture de monocytes murins avec UMR 106 (une lignée ostéoblastique de rat), et une coculture de monocytes murins avec ST2 (une lignée stromale de rat), lors des phases de la différenciation. La PGE<sub>2</sub> a un effet inhibiteur sur l'ostéoclastogénèse dans le système avec UMR 106, mais au contraire, la PGE<sub>2</sub> stimule la formation d'ostéoclastes et de la résorption osseuse dans le système de coculture monocytes/ST2 par l'augmentation de l'expression du RANKL (YASUDA *et al.*, 1998a). Ces résultats suggèrent que les prostaglandines agissent de façon importante sur les précurseurs ostéoclastiques et que ces effets sont dépendants non seulement de la sorte ou la dose des prostaglandines administrées, mais aussi de l'origine des cellules stromales qui supportent la formation des ostéoclastes. Il est fort probable que la distribution des récepteurs aux prostaglandines entre les cellules stromales et les cellules ostéoblastiques puisse expliquer les variations des effets observés.

Des résultats de Patrice Sarrazin (SARRAZIN *et al.*, soumis) ont démontré que les deux isoenzymes de la cyclooxygénase sont présents dans les ostéoclastes, mais que la COX-2 est très active même dans des conditions sans stimulation. Il est donc possible que les ostéoclastes produisent des prostaglandines à effets autocrines qui stimulent leur différenciation et leur activité de résorption osseuse.

Le métabolisme osseux est un processus sous un contrôle très draconien qui implique le couplage entre la formation osseuse et la résorption osseuse. La formation osseuse est la fonction principale des ostéoblastes et elle peut être influencée par une large gamme de facteurs de croissance et d'hormones. Plusieurs de ces facteurs influencent aussi les cellules préostéoclastiques qui une fois différenciées en ostéoclastes constituent les cellules responsables de la résorption osseuse (UDAGAWA *et al.*, 1995; JILKA, 1986a; KAJI *et al.*, 1996a). Une première découverte est que la différenciation des ostéoclastes nécessite et est dépendante de la présence d'ostéoblastes ou de cellules stromales (UDAGAWA *et al.*, 1995; JILKA, 1986b; KAJI *et al.*, 1996b; JIMI *et al.*, 1996; SUDA *et al.*, 1997a; KAJI *et al.*, 1996c; MARTIN & NG, 1994). Ils ont démontré que les précurseurs ostéoclastiques mis en coculture avec des cellules stromales ne se différenciaient pas lorsque séparé par une membrane (JIMI *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 1988).

Des évidences s'accumulent sur la suggestion que les prostaglandines jouent un rôle très important dans les processus physiologiques et pathologiques du métabolisme osseux (KAWAGUCHI *et al.*, 1995a, KAWAGUCHI *et al.*, 1995b, MIYAURA *et al.*, 1995). Les prostaglandines sont des régulateurs multifonctionnels et leurs effets sur l'os sont complexes. Lorsque les prostaglandines de la série E sont administrées *in vivo*, l'effet majeur semble être une stimulation de la formation de l'os (SONE *et al.*, 1980, RINGEL *et al.*, 1982, JEE *et al.*, 1985, YANG *et al.*, 1993). De plus, il a été démontré que les prostaglandines stimulent la formation de nodules osseux *in vitro* (FLANAGAN *et al.*, 1992). En contraste, les PGE<sub>2</sub> sont des stimulateurs puissants de la résorption lors de la culture d'organes (RAISZ *et al.*, 1984, MUNDY *et al.*, 1987). Les prostaglandines

encouragent aussi la formation de cellules semblables aux ostéoclastes lors de la culture de la moelle osseuse de souris (AKATSU *et al.*, 1989).

Les effets cellulaires des  $\text{PGE}_2$  se font par leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires. À partir d'études pharmacologiques, les récepteurs ont été classés en 4 sous-types, de  $\text{EP}_1$  à  $\text{EP}_4$  (COLEMAN *et al.*, 1989, COLEMAN *et al.*, 1994).

L'inaccessibilité des ostéoclastes humains empêche les études de la biologie cellulaire de l'os normal ainsi que la pathophysiologie des dysfonctions cellulaires qui surviennent lors des maladies métaboliques de l'os humain. Pour développer un système propice pour l'étude des cellules humaines qui possède des caractéristiques d'ostéoclastes *in vitro* et les effets des prostaglandines sur ces mêmes cellules, nous nous sommes appliqués sur une culture de cellules humaines fœtales du foie et de la rate. Le foie et la rate sont, à ce stade de la gestation, les localisations les plus importantes de l'hématopoïèse pour le fœtus. Le rationnel pour cette approche est basé sur le fait que les ostéoclastes sont dérivés de cellules souches mononucléées présentes dans la moelle osseuse. Cette conclusion est largement basée sur des études chez la souris et l'humain, atteints d'ostéopétrose (résultat de la dysfonction des ostéoclastes) qui furent guéris de leur affliction une fois transplantées avec de la moelle osseuse normale (WALKER, 1975, COCCIA *et al.*, 1980).

## **2. Inflammation, les isoenzymes de la cyclooxygénase et les prostaglandines**

L'inflammation est un processus complexe qui comprend plusieurs événements initiés par un dommage causé par des facteurs endogènes tels que la nécrose d'un tissu ou la fracture d'un os ainsi que par des facteurs exogènes. Ceux-ci incluent plusieurs types de blessures tels que mécanique (coupure), physique (brûlure), biologique



(infection par des micro-organismes) et immunologique (hypersensibilité et auto-immunité). La réponse inflammatoire est une partie importante de l'immunité innée et acquise. L'inflammation a évolué comme une réponse contre l'infection et les blessures. Par contre, dans certains cas comme l'hypersensibilité et l'auto-immunité, l'inflammation devient un problème plus qu'une solution. La réponse inflammatoire est essentiellement une réponse protectrice et est un effet majeur d'une blessure ; elle constitue un processus qui vise le retour du tissu endommagé à son état normal.

La plupart des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire sont phagocytaires consistant premièrement de leucocytes polymorphonucléaires qui libèrent des enzymes lysosomals et tentent de phagocyter l'étranger. Si la cause de l'inflammation persiste, la région affectée sera infiltrée par des macrophages et des lymphocytes. Les macrophages aident l'activité phagocytaire des leucocytes et participent à la présentation des antigènes aux lymphocytes. Finalement, les lymphocytes répondent aux antigènes par l'induction de la réponse immune acquise spécifique à ces antigènes.

Parfois, il est difficile ou impossible d'enlever la cause de l'inflammation. Ceci résulte en une inflammation chronique, ce qui arrive dans l'activation chronique de la réponse comme l'arthrite rhumatoïde. Dans ces cas, la réponse inflammatoire continue, mais peut-être modifiée temporairement par l'administration d'agents anti-inflammatoires tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (aspirine, ibuprofène, indométacine, ...) ou par des anti-inflammatoires stéroïdiens tels que la cortisone et le dexaméthasone.

L'inflammation implique toute une gamme d'enzymes d'activation, de relâche de médiateurs, de migration cellulaire, de dégradation des tissus et de leurs réparations. La réponse inflammatoire est communément divisée en trois phases : l'inflammation aiguë, la réponse immunitaire et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est la réponse initiale à une blessure. Elle est menée par la relâche d'autacoïdes et précède habituellement le développement de la réponse immunitaire. La réponse immunitaire a lieu lorsque des cellules immunitaires sont activées en réponse à un organisme étranger ou à une substance antigénique libérée lors de la réponse inflammatoire aiguë ou la réponse inflammatoire chronique. L'issue de la réponse immunitaire peut être bénéfique. Par contre, l'issue peut être nocive si la réponse devient chronique sans dénouement à la cause de l'inflammation. L'inflammation chronique implique la relâche d'un grand nombre de médiateurs comme les interleukines, les interférons et le facteur nécrosant tumoral (TNF). Il existe plusieurs conditions médicales qui impliquent ces médiateurs, l'une des principales est l'arthrite rhumatoïde, où la relâche de ces médiateurs résulte en douleur, en destruction de l'os et du cartilage, ce qui peut amener une infirmité grave.

Lors d'un dommage cellulaire dû à l'inflammation, les leucocytes libèrent des enzymes lysosomales. L'acide arachidonique est ensuite libérée des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase  $A_2$  d'où une variété de composés est synthétisée.

En 1971, des chercheurs londoniens John Vane, Bryan Smith et Anthony Willis ont proposé un mécanisme biochimique de l'action des AINS (VANE, 1971). Ils ont constaté que ces substances empêchent la production des prostaglandines en inhibant la cyclooxygénase. La COX est une enzyme à double fonction : une activité de

dioxygénase et une activité de peroxydase. Elle catalyse la conversion d'un acide gras essentiel, l'acide arachidonique, en prostaglandines intermédiaires (PGH<sub>2</sub> et PGG<sub>2</sub>) qui sont transformées à leur tour en prostaglandines actives (DEWITT, 1991). Dans l'estomac, ces hormones protègent la muqueuse (WHITTLE *et al.*, 1980). Dans le rein, elles participent probablement au maintien du flux sanguin (GANS *et al.*, 1990). Toutefois, certaines, notamment la PGE<sub>2</sub> et la PGI<sub>2</sub> (prostacycline), participent à l'inflammation (en stimulant la dilatation des vaisseaux sanguins) (SOLOMON *et al.*, 1968; WILLIAMS et PECK, 1977) et contribuent au début de la sensation de douleur (FERREIRA, 1972). On comprend donc pourquoi l'inhibition globale de la production des prostaglandines par les AINS produit un effet anti-inflammatoire ainsi que des effets secondaires digestifs et rénaux (CLIVE et STUFF, 1984; FOURNIER *et al.*, 1986).

Pendant des années, on a pensé que l'inhibition de l'enzyme COX réduisait la production, non seulement des prostaglandines indésirables dans le tissu enflammé, mais aussi celle des prostaglandines bénéfiques dans l'estomac, le rein et d'autres organes. Néanmoins, en 1991, deux formes distinctes de l'enzyme ont été identifiées (XIE *et al.*, 1991; KUJUBU *et al.*, 1991): une forme constitutive (COX-1), présente à un taux constant dans la plupart des tissus et impliqué dans la production des prostaglandines nécessaires au fonctionnement physiologique normal des tissus et une forme inducible (COX-2), dont l'expression n'intervient que lors de l'inflammation.

À la suite de leur découverte, les deux formes de cyclooxygénase ont été isolées chez plusieurs espèces. Effectivement, les ADNc qui codent pour COX-1 et COX-2 ont été clonés chez la souris, le rat (DEWITT *et al.*, 1990; FLETCHER *et al.*, 1992; MEADE *et al.*, 1993) et l'homme (FUNK *et al.*, 1991; YOKOYAMA *et al.*, 1989; HLA et

NIELSON, 1992). Elles ont été exprimées *in vitro* (XIE *et al.*, 1991; HLA et NIELSON, 1992; FLETCHER *et al.*, 1992; MEADE *et al.*, 1993; FUNK *et al.*, 1991; LORA *et al.*, 1997; LORA *et al.*, 1998). COX-1 et COX-2, de la même espèce, ont environ 60 % d'homologie en acides aminés (SMITH, 1992). Elles possèdent des propriétés enzymatiques similaires (GIERSE *et al.*, 1995), suggérant que le mécanisme enzymatique est fondamentalement le même pour les deux isoenzymes. Par contre, les variations dans les structures primaires entre COX-1 et COX-2 suggèrent qu'il pourrait y avoir des différences subtiles dans le comportement biochimique des deux isoenzymes et que ces dissimilitudes mènent à des différences d'affinités pour les acides gras et les AINS.

Depuis la découverte de la forme inductible de la cyclooxygénase (COX-2), en 1991, un grand nombre de recherches expérimentales ont tenté de comprendre ses rôles physiologiques et son implication dans diverses pathologies. Alors que COX-1 est produite de manière invariable dans la plupart des cellules et des tissus, COX-2 n'est pas exprimé dans les organes à un état normal, sauf dans certaines zones du cortex cérébral du rat et dans une région spécifique du tubule rénal (la macula dense), où son rôle n'est pas connu.

Dans des cellules en culture et chez l'animal, la COX-2 est induite par les cytokines et est exprimée dans les cellules inflammatoires telles que les leucocytes, les macrophages et les lymphocytes (XIE *et al.*, 1991; KUJUBU *et al.*, 1991; MASFERRER *et al.*, 1990; MASFERRER *et al.*, 1992; O'BANNION *et al.*, 1991; SIROIS et RICHARDS, 1992; HLA et NIELSON, 1992). L'expression de COX-2 est inhibée par les glucocorticoïdes et l'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes s'explique partiellement par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dépendante de COX-2

(O'BANNION *et al.*, 1992b; MASFERRER *et al.*, 1990; DE BRUM-FERNANDES *et al.*, 1994; HERSHMAN, 1992; O'BANNION *et al.*, 1992a; O'BANNION *et al.*, 1991). Le gène de COX-2 a certaines caractéristiques d'un gène à réponse précoce et son contrôle de transcription est très complexe. L'identification d'une COX constitutive et d'une COX inductible a permis le développement de l'hypothèse que la COX-2 est l'enzyme responsable de la production des PGs lors de l'inflammation et que la COX-1 est l'enzyme responsable de la production des PGs dans l'homéostasie normale (MASFERRER *et al.*, 1990; MASFERRER *et al.*, 1992; SANO *et al.*, 1992). Ceci a été confirmé dans les membranes synoviales rhumatoïdes humaines (CROFFORD *et al.*, 1994) où l'isoenzyme la plus importante est la COX-2, et les composés capables d'inhiber spécifiquement COX-2 sont anti-inflammatoires mais non ulcérogéniques dans les modèles animaux (MASFERRER *et al.*, 1994; FUTAKI *et al.*, 1994).

## 2.1 Isoenzymes de la cyclooxygénase

Le mécanisme du système enzymatique qui assure les étapes initiales de biotransformation de l'AA est bien connu. L'enzyme qui transforme l'AA en PGG<sub>2</sub> puis en PGH<sub>2</sub>, est en fait une enzyme bifonctionnelle qui assure, sur des sites distincts mais adjacents, une activité de dioxygénase (formation de PGG<sub>2</sub>) et une activité de peroxydase (transformation de PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub>). C'est l'activité enzymatique globale que l'on dénomme cyclooxygénase (COX). La PGH<sub>2</sub> est instable et peut, selon les cas (type cellulaires, interactions cellulaires, nature des préparations enzymatiques, etc.) être transformée en produits biologiquement actifs, tels que les prostaglandines primaires (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), le thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), qui sont associés à des pathologies ou des contrôles particuliers. Selon la nature du contenu

enzymatique cellulaire (isomérases et synthétases), le métabolisme de l'acide arachidonique peut être orienté préférentiellement vers l'une ou l'autre des prostaglandines précédentes dans un tissu donné : PGI<sub>2</sub> dans l'endothélium vasculaire, TxA<sub>2</sub> dans les plaquettes, PGE<sub>2</sub> dans le derme et la muqueuse digestive.

## 2.2 Récepteurs aux prostaglandines

Les prostanoïdes, qui sont constitués de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), des thromboxanes (TxA<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>) et des prostaglandines (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), agissent localement de façon paracrine et autocrine. De plus, ils modulent les réponses physiologiques et pathophysiologiques des cellules et des tissus. Les prostaglandines ont une variété d'effets sur les vaisseaux sanguins, sur les nerfs périphériques et sur les cellules impliquées dans l'inflammation. En règle générale, les prostaglandines ne pénètrent pas dans leurs cellules cibles. Leur message franchit la membrane plasmique grâce à l'intervention des récepteurs protéiques intégrés à la membrane ; activé par une prostaglandine ce récepteur assure la libération d'un messager secondaire relayant les signaux aux enzymes et autres protéines intracellulaires. Les plus importants messagers secondaires sont représentés par l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) et par des molécules dérivées du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), un composant habituel des membranes plasmiques de toutes les cellules eucaryotes. Les prostaglandines interagissent avec leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs à 7 domaines trans-membranaires. Le complexe formé entre une prostaglandine et ses récepteurs protéiques (DP, EP, IP, FP, TP) entre en interaction avec des protéines fixant les nucléotides guanyliques (les protéines G), des protéines membranaires intrinsèques. Celles-ci transmettent alors le signal à d'autres protéines cellulaires, des enzymes qui

opèrent la synthèse de messagers secondaires. Les protéines G activent l'enzyme génératrice du messenger secondaire sont dénommées protéines G stimulatrices ( $G_s$ ) ; celles qui dépriment la même enzyme sont des protéines G inhibitrices ( $G_i$ ). Les deux types de protéines G sont des trimères composés d'une protéine  $\alpha$  fixant les nucléotides guanyliques (soit GDP, soit GTP), d'une protéine  $\beta$  et d'une protéine  $\gamma$ . Les deux types de protéine G oscillent d'une forme inactive à une forme active. La forme inactive est un trimère ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ) dont la protéine  $\alpha$  a fixé GDP. Lorsque le complexe d'une prostaglandine avec son récepteur se lie au complexe protéine G-GDP, ce GDP est substitué par un GTP. Cet échange de nucléotide conduit à la dissociation du trimère en un dimère  $\beta\gamma$  et en un complexe actif  $G_\alpha$ -GTP qui stimule ou inhibe l'enzyme génératrice du messenger secondaire. Comme  $G_\alpha$  est doué d'une activité de GTPase qui hydrolyse GTP en GDP, il porte en lui même le mécanisme d'auto-inactivation pour sa propre régulation ; après hydrolyse du GTP lié, le complexe  $G_\alpha$ -GDP résultant se recombine au dimère  $\beta\gamma$  pour redonner la forme inactive du trimère. L'adénylate cyclase appartient à la catégorie d'enzymes qui produit le messenger secondaire sous contrôle des protéines G et convertit l'ATP en AMP cyclique (AMPc), le messenger secondaire. Liée à une protéine G stimulatrice activée ( $G_s(\alpha)$ -GTP), l'adénylate cyclase catalyse la formation d'AMPc ; liée à une protéine G inhibitrice activée ( $G_i(\alpha)$ -GTP), l'adénylate cyclase perd son activité. La fonction primordiale de l'AMPc dans les cellules est d'activer une protéine kinase dépendante de l'AMPc.

Les protéines  $G_q$  jouent un rôle dans la libération de d'autres messagers secondaires. Dès l'attachement d'une prostaglandine à son récepteur protéique, le complexe hormone-récepteur interagit avec une protéine  $G_q$  et active ainsi la

phospholipase C, par un mécanisme homologue à celui pour l'activation de l'adénylate cyclase. La phospholipase C activée hydrolyse la liaison phosphodiester joignant le groupe inositol 1-phosphate au carbone 3 du glycérol dans la molécule de diacylglycérol, pour libérer le messager secondaire 1,2-diacylglycérol et le messager secondaire  $IP_3$ . Libérée catalytiquement par la phospholipase C, la molécule d' $IP_3$  va se fixer à une protéine d'un canal à calcium du réticulum endoplasmique, ce qui aboutit à une décharge d'ions  $Ca^{2+}$  de la lumière du réticulum vers le cytosol. Ces ions  $Ca^{2+}$  ont des effets multiples, parmi lesquels l'activation de protéine kinases dépendantes de la calmoduline. De concert avec les ions  $Ca^{2+}$ , la molécule de diacylglycérol produite par l'action de la phospholipase C déclenche l'activation d'une protéine kinase spécifique appelée protéine kinase C, pour la distinguer de la protéine kinase liée aux ions de  $Ca^{2+}$  et de la protéine kinase dépendant de l'AMPc.

L'étude des voies de signalisation de transduction des récepteurs aux prostaglandines ont été accompli en examinant après une stimulation avec les agonistes le changement des niveaux de second messager (AMPc,  $Ca^{2+}$  et le phosphatidylinositol) et en identifiant les protéines G auxquels les récepteurs sont couplés. Un résumé des récepteurs aux prostaglandines se retrouve dans les tableaux 1 et 2. Si les prostaglandines agissent dans l'ostéoclastogénèse, elles le font par un ou plusieurs de ces récepteurs. Les effets de ces récepteurs sur l'ostéoclastogénèse pourraient identifier des cibles thérapeutiques pour la régulation de celle-ci ou expliquer les phénomènes de dégradation et de formation de l'os dans différentes pathologies.



Tableau 1 Récepteurs aux PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> et Thromboxanes.

Récepteur	Protéine G	Signal de Transduction	Agonistes	Antagonistes
CRTH2	G <sub>q</sub>	Activation de la PLC et augmentation du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire libre	PGD <sub>2</sub> DK-PGD <sub>2</sub> (GERVAIS <i>et al.</i> , 2001)	
DP	G <sub>s</sub>	Activation de l'adénylate cyclase et augmentation de l'AMPc intracellulaire (BOIE <i>et al.</i> , 1995), (ITO <i>et al.</i> , 1990), (HIRATA <i>et al.</i> , 1994)	PGD <sub>2</sub> BW245C	
FP	G <sub>q</sub>	Activation de la PLC et augmentation de IP <sub>3</sub> et du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire libre (ABRAMOVITZ <i>et al.</i> , 1994), (SUGIMOTO <i>et al.</i> , 1994), (SAKAMOTO <i>et al.</i> , 1994), (CARRASCO <i>et al.</i> , 1996), (RAYMOND <i>et al.</i> , 1983)	Fluprosténol	PGF <sub>2α</sub> Amine PGF <sub>2α</sub> Amide
IP	G <sub>s</sub> ,  G <sub>q</sub>	Activation de l'adénylate cyclase et augmentation de l'AMPc intracellulaire ou Activation de la PLC et augmentation de IP <sub>3</sub> et du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire libre (BOIE <i>et al.</i> , 1994), (NAKAGAWA <i>et al.</i> , 1994), (KATSUYAMA <i>et al.</i> , 1994), (NAMBA <i>et al.</i> , 1994), (OLIVA et NICOSIA, 1987)	Carbaprostacycline	
TPα  TPβ	G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub>  G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub>	Inhibition de l'adénylate cyclase et diminution de l'AMPc intracellulaire ou Activation de la PLC et augmentation de IP <sub>3</sub> et du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire libre ou Activation de l'adénylate cyclase et augmentation de l'AMPc intracellulaire	U-46619  (RACHOWDHURY <i>et al.</i> , 1994), (HIRATA <i>et al.</i> , 1991), (NAMBA <i>et al.</i> , 1992)	SQ 29548

Tableau 2 Récepteurs à la PGE<sub>2</sub>.

Récepteur	Protéine G	Signal de Transduction	Agonistes	Antagonistes
EP1	G <sub>q</sub>	Activation de la PLC et augmentation de IP <sub>3</sub> et du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire libre (FUNK <i>et al.</i> , 1993), (WATABE <i>et al.</i> , 1993)	PGE <sub>2</sub> 17 phenyl trinorPGE <sub>2</sub>	SC-19220 AH6809
EP2	G <sub>s</sub>	Activation de l'adénylate cyclase et augmentation de l'AMPc intracellulaire (REGAN <i>et al.</i> , 1994)	PGE <sub>2</sub> Butaprost 11 deoxy PGE <sub>1</sub>	AH6809
EP3	G <sub>i</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub>	<b>Selon les isoformes humains (3 à 6 formes) :</b> Inhibition de l'adénylate cyclase et diminution de l'AMPc intracellulaire ou Activation de la PLC et augmentation de IP <sub>3</sub> et du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire libre ou Activation de l'adénylate cyclase et augmentation de l'AMPc intracellulaire (ADAM <i>et al.</i> , 1994), (KUNAPULI <i>et al.</i> , 1994), (YANG <i>et al.</i> , 1994), (KOTANI <i>et al.</i> , 1995), (SCHMID <i>et al.</i> , 1995)	PGE <sub>2</sub> Sulprostone	
EP4	G <sub>s</sub>	Activation de l'adénylate cyclase et augmentation de l'AMPc intracellulaire (AN <i>et al.</i> , 1993), (MORI <i>et al.</i> , 1996), (BASTIEN <i>et al.</i> , 1994), (NISHIGAKI <i>et al.</i> , 1995), (BREYER <i>et al.</i> , 1996), (HONDA <i>et al.</i> , 1993)	PGE <sub>2</sub> 11 deoxy PGE <sub>1</sub>	AH23848B

### 3. Hématopoïèse chez le fœtus

Les trois principaux lieux où se déroule l'hématopoïèse fœtale sont le sac vitellin, le foie et la moelle osseuse, la rate jouant un rôle plus accessoire.

Le premier signe d'hématopoïèse apparaît dans les îlots sanguins du sac vitellin vers le vingtième jour de vie intra-utérine. On croit généralement que les cellules sanguines, constituées principalement de globules rouges, sont formées dans le feuillet mésodermique du sac vitellin. À ce stade, l'érythropoïèse est principalement intravasculaire. Les îlots du sac vitellin jouent un rôle actif jusqu'à la douzième semaine de la grossesse.

L'hématopoïèse fœtale proprement dite débute dans le foie vers la sixième semaine. Le foie produit alors les trois lignées myéloïdes et demeure le principal organe hématopoïétique jusqu'au sixième mois de la gestation. Il peut continuer à produire des globules sanguins chez le nouveau-né durant plusieurs semaines. Comme la synthèse des éléments cellulaires au niveau hépatique est extravasculaire, les cellules adultes doivent pénétrer dans l'espace vasculaire pour atteindre la circulation sanguine. D'autre part, la rate commence à produire des globules seulement entre le quatrième et le huitième mois. Enfin, la moelle osseuse prend la relève aux environs de la dixième semaine et devient le principal lieu d'hématopoïèse après le sixième mois. Du troisième trimestre de la vie intra-utérine jusqu'à la mort, c'est le seul organe qui produit les érythrocytes, les granulocytes et les plaquettes.

Par ailleurs, la granulopoïèse est présente dans le parenchyme hépatique vers la septième semaine, mais elle ne s'amorce vraiment dans la moelle osseuse que trois semaines plus tard. Les mégacaryocytes et les précurseurs macrophagiques sont présents

dans le sac vitellin et le foie à partir de la sixième semaine de gestation, dans la rate à la dixième semaine et dans la moelle osseuse à la treizième semaine. Le développement macrophagique, la différenciation et la prolifération sont régulés par le microenvironnement des tissus avec la production des facteurs de croissances macrophagiques chez le fœtus et l'adulte.

Le foie devient le site prédominant de l'hématopoïèse à 15 semaines de gestation chez l'humain et est ainsi jusqu'à la fin de la gestation (MORRISON *et al.*, 1995). Les cellules souches hématopoïétiques se développent dans le foie fœtal accompagné par la génération de cellules précurseurs myéloïdes et lymphoïdes (MOORE et METCALF, 1970; JOHNSON et MOORE, 1975; IKUTA *et al.*, 1990; CUMANO *et al.*, 1992; MÜLLER *et al.*, 1994; EMA *et al.*, 1998). Les populations microenvironmental des cellules du foie fœtal seraient associées au développement de l'hématopoïèse. Les cellules stromales produites des cultures primaires du foie fœtal humain ont des phénotypes de cellules mésenchymateuses et épithéliales. Les cellules de souches mésenchymateuses ont une excellente capacité de support des cellules hématopoïétiques (NOORT *et al.*, 2002; ALMEIDA-PORAGA *et al.*, 2000; ALMEIDA-PORAGA *et al.*, 1999). De plus, les cellules souches mésenchymateuses sont multipotentes et capables de se différencier en lignées ostéogéniques, adipogéniques et chondrogéniques (CAPLAN, 1994; PITTENGER *et al.*, 1999; BIANCO et GEHRON, 2000; DEANS et MOSELEY, 2000; PROCKOP, 1997). On retrouve aussi différents types de cellules souches hépatiques dont les hépatoblastes qui se différencient en hépatocytes chez le foie adulte (FIEGEL *et al.*, 2003).

## Problématique

Les prostaglandines affectent la différenciation et l'activité des ostéoclastes *in vivo* et *in vitro* comme il a été démontré dans plusieurs modèles animaux. Par contre, les résultats décrits dans la littérature sont paradoxaux ou même contradictoires. Nous croyons que ceci est partiellement dû à la complexité de la pharmacologie des prostaglandines. Alors, pour déterminer l'implication des prostaglandines et des cyclooxygénases (COX) dans l'ostéoclastogénèse humaine nous avons, dans un premier temps, développé un système d'ostéoclastogénèse qui permet d'étudier la différenciation des cellules en ostéoclastes. Deuxièmement, nous avons observé l'inhibition des COX par l'indométacine et par l'ibuprofène et leur effet sur le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. Nous avons alors recherché quelle cyclooxygénase est responsable de ces effets sur le phénotype ostéoclastique. Les inhibiteurs spécifiques de la COX-2, le DFU et le NS-398, ainsi que l'inhibition de la COX-1 par le valéryl salicylate permettront d'identifier les isoenzymes de la COX responsables de la variation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. Troisièmement, avec les interventions pharmacologiques des inhibiteurs des COX et des agonistes des récepteurs aux prostaglandines, nous étudierons le rythme de différenciation des cellules précurseurs en ostéoclastes et nous déterminerons quels sont les récepteurs aux prostaglandines impliqués dans l'ostéoclastogénèse humaine. Quatrièmement, nous vérifierons les résultats des agonistes avec l'aide d'antagonistes spécifiques aux récepteurs observés dans le système. Finalement, nous déterminerons par quelle voie les prostaglandines et les inhibiteurs des COX agissent sur l'ostéoclastogénèse. Il est fort probable que les prostaglandines soient impliquées dans le système de régulation de l'ostéoclastogénèse RANKL/RANK/OPG.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1. Anti Inflammatoire Non Stéroïdiens (AINS)**

L'indométacine et l'ibuprofène ont été achetés de Sigma Chemicals CO. (St-Louis, MO). Le NS-398 et le valéryl salicylate a été acheté de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Le DFU (5,5-diméthyl-3(3-fluorophenyl)-4-(4-méthylsulfonyl)phenyl-2(5H)-furanone), un dérivé fluoré du rofecoxib, est un cadeau de Merck Frosst (Kirkland, QC).

### **2. Agonistes et antagonistes des récepteurs aux prostaglandines**

Le BW245C, la PGE<sub>2</sub>, le SC-19220, le butaprost, le sulprostone, le fluprosthénol, la PGF<sub>2α</sub> diméthyl amine, la PGF<sub>2α</sub> diméthyl amide, la carbaprostacyclin, le U46619 et le SQ 29,548 ont tous été achetés de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Le AH23848B est un cadeau de Calbiochem (La Jolla, CA).

### **3. Recherche du modèle de culture**

Notre premier obstacle était de trouver un système de culture qui nous permettrait d'étudier l'implication des cyclooxygénases dans l'ostéoclastogénèse humaine. Les fœtus ont été obtenus suite à la signature d'un consentement éclairé par la patiente conformément à la loi civile du Québec. Le projet a aussi été approuvé par le comité d'éthique de la recherche sur l'humain du CHUS et de la faculté de médecine de l'université de Sherbrooke.

### 3.1 Culture de l'os dégénéré

Les fémurs et les tibias sont d'abord prélevés de fœtus humains (15 sem à 20 sem). Les os sont disséqués de tous tissus mous et mécaniquement émincés avec un scalpel dans du  $\alpha$ -MEM contenant 10 % FBS. On retire les fragments d'os par sédimentation à gravité normale, les cellules de l'os se retrouvent dans cette suspension de cellules et sont récupérées. Les cellules de la suspension sont mises en culture dans des plaques à 24 puits à une densité de 1 000 000 cellules par puits dans du  $\alpha$ -MEM contenant 10 % FBS à 37° C à 5 % CO<sub>2</sub> dans un air humidifié pour 8 jours. Après 8 jours, les ostéoclastes pré-existants au début de la culture ne sont plus présents puisqu'ils ont une durée de vie *in vitro* maximale de 3 jours et ils ont donc dégénéré. Les produits à étudier sont maintenant ajoutés à cette culture d'os sans ostéoclastes avec 1, 25 dihydroxyvitame D<sub>3</sub> à 10<sup>-8</sup> M. La culture est entretenue pendant 7 à 38 jours, avec changement du milieu contenant les produits étudiés tous les 3 et 4 jours. À la fin de la culture, les cellules sont rincées avec le PBS deux fois, fixées avec une solution 1 :1 éthanol/acétone et finalement colorées pour l'activité TRAP.

Un protocole semblable a été suivi pour des préparations d'os de souris adultes, mais nous n'avons observé aucune coloration pour la phosphatase acide résistante au tartrate.

### 3.2 Coculture des cellules de rate fœtale humaine et des cellules SaOS-2

Pour leur part, les rates sont prélevées des fœtus humains et émincées avec le scalpel. La suspension de cellules provenant des rates émincées est mise en culture pendant 5 jours avec le  $\alpha$ -MEM 10 % FBS et un changement du milieu est fait au jour 3. Les cellules ostéoblastiques SaOS-2 (ATCC) sont propagées dans le milieu McCoy's 5A

avec 10 % FBS. Les SaOS-2 sont, par la suite, répliquées avec le milieu  $\alpha$ -MEM 10 % FBS, de la dexaméthasone ( $10^{-6}$  M) et 1, 25 dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> ( $10^{-8}$  M) à une densité de 100 000 cellules par puit de 35 mm. Après trois jours de culture des SaOS-2, une suspension des cellules de la rate (5 jours de culture) est préparée avec de la trypsine et est ajoutée à la culture de SaOS-2 à une densité de 300 000 cellules par puit de 35 mm. Le milieu est changé à tout les 3 jours avec le 1, 25 dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> ( $10^{-8}$  M) et les composés à étudier pendant 22 jours. À la fin de la culture, les cellules sont rincées avec le PBS deux fois, fixées avec une solution 1 :1 éthanol/acétone et finalement colorées pour l'activité TRAP.

### **3.3 Coculture des cellules de rate fœtale humaine et des cellules SaOS-2 fixées**

Les rates sont prélevées des fœtus humains et émincées avec le scalpel. La suspension de cellules est mise en culture pendant 5 jours avec le  $\alpha$ -MEM 10 % FBS et un changement du milieu au jour 3. Les cellules ostéoblastiques SaOS-2 (ATCC) sont propagées dans le milieu McCoy's 5A avec 10 % FBS. Les SaOS-2 sont, par la suite, répliquées avec le milieu  $\alpha$ -MEM 10 % FBS, de la dexaméthasone ( $10^{-6}$  M) et 1, 25 dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> ( $10^{-8}$  M) à une densité de 100 000 cellules par puit de 35 mm. Après trois jours de culture des SaOS-2, les SaOS-2 sont fixées avec une solution 1 % paraformaldéhyde pendant 20 minutes et rincées 4 fois avec le PBS. Par la suite, une suspension des cellules de la rate (en culture pendant 5 jours) est préparée avec de la trypsine et est ajoutée à la culture de SaOS-2 qui est maintenant fixée et ce, à une densité de 300 000 cellules par puit de 35 mm. Le milieu est changé à tous les 3 jours avec le 1, 25 dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> ( $10^{-8}$  M) et les composés à étudier pendant 22 jours. À la fin



de la culture, les cellules sont rincées avec le PBS deux fois et fixées avec une solution 1 : 1 éthanol/acétone et finalement colorées pour l'activité TRAP.

### **3.4 Culture des cellules du foie pour le système d'ostéoclastogénèse**

Les foies des fœtus humains de 15 semaines à 20 semaines d'âge sont prélevés et émincés avec le scalpel et par la suite, mis en culture dans 5 à 8 pétris de culture cellulaire (Falcon 3003) de 10 cm avec 10 ml de  $\alpha$ -MEM 10 % FBS pen/strep. Au jour 3, le milieu est changé. Lors du jour 6, les cellules sont rincées avec du PBS deux fois et resuspendues après une digestion avec la trypsine. Le tout est filtré à travers une mèche de 0.5 mm stérile pour obtenir une suspension de cellules sans débris de tissus. La préparation est diluée à 100 000 cellules par ml. 100  $\mu$ l de cette suspension de cellules du foie sont délicatement aliquotés dans chaque puit des plaques à 96 puits. Les plaques sont incubées pour 2 à 3 heures à 37°C. Les composés à étudier sont par la suite ajoutés avec 100  $\mu$ l de milieu de culture. Le milieu est changé une seule fois au jour 9 avec les composés. Au jour 12, les cellules sont rincées avec le PBS deux fois et fixées avec une solution d'éthanol et acétone 1:1 pendant 2 minutes. Par la suite, les cellules sont rincées deux fois avec de l'eau désionisée et colorée pour l'activité de la phosphatase acide résistante au tartrate (Trousse Sigma 307-A). Dix à vingt minutes de coloration sont habituellement suffisantes. Les cellules TRAP<sup>+</sup> dans un champ à un grossissement de 200x sont comptées et analysées (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). Avec ce même protocole de culture des cellules de foie fœtal et en présence de M-CSF et de RANKL, Rana Samadfam, une coéquipière, a observé des puits de résorptions sur une matrice d'hydroxyapatite.

#### 4. Expression de la TRAP

La présence de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) a été démontrée en effectuant une coloration enzymatique avec une trousse commerciale. En résumé, les cellules ont d'abord été rincées deux fois avec du PBS pour ensuite être fixées pendant 2 minutes avec un mélange 1 :1 d'acétone et d'éthanol. Le fixateur a été aspiré et les cellules sont rincées deux fois avec de l'eau désionisée. Par la suite, les cellules ont été incubées de dix à vingt minutes à 37°C avec la solution de coloration contenant 50 mM tartrate. Les cellules ont ensuite été rincées à l'eau et les lamelles ont été montées sur des lames de microscope et observées en microscopie à champ clair dans le but d'évaluer la présence de la TRAP qui provoque une coloration rouge. Pour les plaques à 96 puits les cellules sont observées directement dans le puits.

#### 5. Extraction d'ARN<sub>total</sub>

L'ARN total est extrait des cellules du foie en utilisant le TRIzol® Reagent (Gibco BRL, Burlington, Ont). Les cellules ont été mise en culture dans des petris de 10 cm avec 1 000 000 de cellules dans 10 ml de milieu  $\alpha$ MEM complet contenant les composés à étudier avec un changement de milieu contenant les composés à étudier le quatrième jours. Le huitième jours, nous avons procédé à l'extraction d'ARN total. une semaine après le traitement avec les composés. Brièvement, on enlève le surnageant et on ajoute 1 ml de TRIzol® Reagent (DE BRUM-FERNANDES *et al.*, 1994). Après une incubation de 5 minutes, on recueille la solution dans un tube à microcentrifuge. On ajoute 0,2 ml de chloroforme, on mélange au vortex et on met au repos 3 minutes à température de la pièce. Ensuite, on centrifuge à 12000 g, 15 minutes et à 4°C. Une fois la centrifugation terminée, on prélève la phase aqueuse dans un nouveau tube à microcentrifuge. On

recommence avec 0,5 ml de chloroforme, on mélange au vortex et on met au repos 3 minutes à température de la pièce. On centrifuge à 12000 g, 15 minutes et à 4°C. On transfère la phase aqueuse dans un tube à microcentrifuge. Par la suite, on ajoute 500  $\mu$ l d'isopropanol, on mélange délicatement, on incube 10 min à température de la pièce et on centrifuge à 12 000 g, 10 minutes et à 4°C. On enlève le surnageant, on rince le culot avec 0,5 ml d'éthanol 70 % et on centrifuge à 12 000 x g, 10 minutes et à 4°C. On enlève le surnageant et on sèche le culot à l'air 5 minutes. Finalement, les ARNs sont dissous dans de l'eau traitée avec le diéthylpyrocarbonate (DEPC). La concentration d'ARN dans les échantillons est vérifiée par dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 260 nm (O.D. 1 = 40  $\mu$ g d'ARN/ml) et à une longueur d'onde de 280 nm. On fait ensuite le rapport 260 nm/280 nm pour déterminer la qualité de l'ARN. Un rapport entre 1.5 et 2.0 indique un ARN bien purifié et propice au buvardage Northern ou à des essais de transcriptase inverse avec une réaction de polymérase en chaîne (RT-PCR).

## **6. Essais de transcriptase inverse avec une réaction de polymérase en chaîne**

Après l'extraction de l'ARN, des essais de transcriptase inverse avec une réaction de polymérase en chaîne ont été complétés pour plusieurs gènes marqueurs des ostéoclastes. La transcription inverse a été faite avec 5  $\mu$ g d'ARN total dans 30  $\mu$ l de tampon transcriptase inverse SuperScript II (GibcoBRL, Grand Island, NY) contenant 50 pmoles d'oligonucléotides poly-d(t), 6 mM DTT, 0.3 mM dNTPs et 400 unités de transcriptase inverse SuperScript II. La réaction a été faite à 37°C pour 1 heure, et a été suivie d'une digestion de l'ARN par une RNase sans DNase pour 30 minutes. Finalement, la réaction est arrêtée par une incubation à 70°C pour 20 minutes. Par la suite, 2  $\mu$ l du produit de transcriptase inverse a été incubé avec 1  $\mu$ l de dNTP (10 mM), 1

$\mu$ l de chaque amorce, 3  $\mu$ l de tampon de PCR 10x, 21  $\mu$ l H<sub>2</sub>O et 1  $\mu$ l de polymérase d'ADN TAQ et selon les temps et température appropriés pour chaque ARNm étudié (tableau 3). Une électrophorèse de 10  $\mu$ l de chaque produit de PCR a été faite sur des gels d'agarose 1.2% contenant 1  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium. Les amorces, les protocoles de PCR ainsi que le nombre de cycle optimisé pour chaque ARNm ciblé proviennent des articles de TONG *et al.* (1994) et UDAGAWA *et al.* (1990).

Tableau 3 Amorces pour PCR

ARN cible	Amorce en Amont	Protocole du PCR (cycle)	Nombre de cycle	pb du fragment
	Amorce en Aval			
CAII	5'-CTC TCA GGA CAA TGC AGT GC-3'	1 min à 95 °C 55 sec à 55 °C 3 min à 72 °C	35	410
	5'-ATC CAG GTC ACA CAT TCC AGA-3'			
Cathepsin K	5'-GGC CAA CTC AAG AAG AAA AC-3'	1 min à 94 °C 1 min à 55 °C 2 min à 72 °C	30	426
	5'-GTG CTT GTT TCC CTT CTG G-3'			
CTR	5'-ACT GCT GGC TGA GTG TGG AAA-3'	45 sec à 94 °C 90 sec à 64 °C 3 min à 72 °C	36	316
	5'-GAA GCA GTA GAT GGT CGC AAC-3'			
GAPDH	5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3'	1 min à 95 °C 1 min à 63 °C 3 min à 72 °C	30	937
	5'-CCA TGA GGT CCA CCA CCC TG-3'			
Intégrin B <sub>3</sub>	5'-GTG ACC TGA AGG AGA ATC TGC-3'	30 sec à 95 °C 30 sec à 55 °C 1 min à 72 °C	40	183
	5'-TTC TTC GAA TCA TCT GGC C-3'			
MMP-9	5'-GAG GTT CGA CGT GAA GGC GCA GAT G-3'	1 min à 95 °C 1 min à 65 °C 3 min à 72 °C	30	200
	5'-CAT AGG TCA CGT AGC CCA CTT GGT C-3'			
RANK	5'-AAC CTT CGG AGT AGC TGG G-3'	20 sec à 95 °C 45 sec à 60 °C 1 min à 72 °C	30	618
	5'-TTC CAG GAG CCC CAT GTC CT-3'			
OPG	5'-CCT TTG CCC TGA CCA CTA C-3'	1 min 95 °C 1 min 65 °C 1 min 72 °C	35	460
	5'-CCT GAA GAA TGC CTC CTC-3'			

## **7. Essai pour déterminer l'implication des COX dans l'ostéoclastogénèse**

Après l'aliquotement des cellules dans les plaques à 96 puits, on procède à l'inhibition des cyclooxygénases 1 et 2 par l'addition des AINS (l'indométacine, l'ibuprofène, le DFU, le NS-398 et le valéryl salicylate) sur les préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) pendant 8 jours. Un changement du milieu avec les AINS est fait le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules sont fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates est accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été calculé dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>).

## **8. Essai pour déterminer l'implication des PGs dans l'ostéoclastogénèse**

### **8.1 Avec les agonistes**

Après l'aliquotement des cellules dans les plaques à 96 puits, on procède à l'inhibition des cyclooxygénases 1 et 2 par l'addition de l'indométacine et on ajoute les agonistes aux récepteurs des prostaglandines sur les préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) pendant 8 jours. Un changement du milieu avec l'indométacine et les agonistes est fait le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules sont fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates est accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été calculé dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>).

## 8.2 Avec les antagonistes

Après l'aliquotement des cellules dans les plaques à 96 puits, on procède à l'inhibition des récepteurs des prostaglandines par l'addition des antagonistes sur les préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) pendant 8 jours. Un changement du milieu avec les antagonistes est fait le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules sont fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates est accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été calculé dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>).

## 9. ELISA Sandwich pour OPG

Une trousse commerciale (R&D systems) d'ELISA sandwich a été utilisée pour mesurer la quantité d'OPG dans le surnageant des cellules en culture. Brièvement, 60 µl/puit d'anticorps de capture d'OPG (2 µg/ml, dilué dans le PBS) a été ajouté à la plaque d'ELISA (Corning Incorporated, haute affinité, puits plats, 96 puits) et incubé pour 16 heures à température pièce. Par la suite, chaque puit est aspiré et rincé 3 fois avec le PBS contenant 0.05 % tween 20 (tampon de rinçage). La plaque est bloquée avec 300 µl de PBS contenant 1 % albumine de sérum bovin (Sigma, St-Louis, MO), 5 % sucrose (Sigma, St-Louis, MO) et 0.05 % NaN<sub>3</sub> (Sigma, St-Louis, MO) (tampon de blocage) à chaque puit pour une heure. Le tampon de blocage est retiré et chaque puit est rincé 3 fois avec le tampon de rinçage. Les échantillons et la courbe standard sont dilués dans le PBS et 60 µl des dilutions sont aliquotées par puit (duplicata pour chaque dilution) et incubées pour 2 heures à température pièce. Après le rinçage avec le tampon de rinçage, l'anticorps de détection (800 ng/ml, dilué dans le tampon de blocage) est ajouté à chaque puit et incubé pour 2 heures. Encore une fois, les puits sont rincés avec le tampon de

rinçage et incubés avec 60  $\mu$ l de streptavidine couplé à la peroxydase de raifort (trousse commerciale, R&D systems )(dilué 1/200 dans le PBS) pour 35 minutes. La présence du complexe enzyme-protéine est analysée avec le substrat tetramethylbenzidine/ $H_2O_2$  et la réaction est arrêtée avec 50  $\mu$ l d'acide phosphorique à 1M. L'activité enzymatique est analysée à 450 nm.

## 10. Extraction des ostéoclastes

La méthode d'extraction d'ostéoclastes humains matures a été élaborée en se basant sur une méthode similaire décrite pour extraire des ostéoclastes de lapins (Chambers *et al.*, 1982). Les ostéoclastes matures ont été extraits à partir d'os longs de fœtus dont l'âge variait entre 14 et 18 semaines de gestation. Les tibias et les fémurs ont été prélevés et dénudés de tout le tissu conjonctif. Les os ont ensuite été coupés transversalement dans un pétri de 10 cm contenant 6 ml de milieu  $\alpha$ -MEM supplémenté de 10 % FBS. Les os ont ensuite été grattés à l'aide d'un scalpel pour les réduire en de très petits fragments. Les os émincés et le milieu ont été transférés, à l'aide d'une pipette sérologique en plastique, dans un tube conique de 15 ml et vortexés à vitesse moyenne pendant 30 secondes. La préparation a été laissée au repos pendant environ 1 minute afin de laisser les fragments d'os sédimenter. Ensuite, 200  $\mu$ l de surnageant contenant les cellules ont été aliquoté sur une série de lamelles de verre et mise en culture. Pour toutes les procédures, des lamelles de 22 mm x 22 mm disposées dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits ont été utilisées. Pour permettre l'attachement des ostéoclastes, les cellules ont été placées dans l'incubateur à 37°C dans un environnement constitué de 5 %  $CO_2$  pendant 45 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec PBS pour retirer les cellules non adhérentes. Les cellules ont été gardées dans 2 ml de  $\alpha$ -



MEM 10 % FBS dans l'incubateur à 37 °C jusqu'à leur utilisation, environ 20 heures plus tard.

### **11. Essais des PG chez les ostéoclastes matures**

Vingt heures après l'extraction, le milieu des ostéoclastes a été remplacé par 2 ml de nouveau milieu  $\alpha$ -MEM contenant 2  $\mu$ M indométacine. Les cellules ont été incubées 1 heure à 37 °C avant l'addition des composés pour permettre un retour à l'équilibre des structures d'actine. Lors des expériences, les composés ont été ajoutés au temps zéro. De plus, la réaction a été arrêtée après 5 minutes de stimulation avec les composés en aspirant le milieu et en ajoutant 1 ml de la solution de fixation. Les cellules ont été fixées avec du PBS contenant 3.7 % de formaldéhyde pendant 10 minutes et rincées 2 fois avec du PBS.

### **12. Coloration des filaments de F-actine**

Pour montrer la présence des différentes structures d'actine chez les ostéoclastes nous avons employé une approche déjà décrite dans la littérature (Zhang *et al.*, 1995) qui consiste à faire une coloration enzymatique pour la TRAP suivie d'un marquage des filaments de F-actine que l'on retrouve chez les ostéoclastes.

Les cellules ont été perméabilisées avec du PBS contenant 0.1 % Triton-X-100 pendant 5 minutes. Après 2 rinçages au PBS, les cellules ont été incubées avec la solution de coloration TRAP de la trousse #387-A de Sigma pendant 10 minutes. Après 2 lavages avec du PBS, 200  $\mu$ l de PBS contenant 5  $\mu$ l de phalloïdine conjuguée à la rhodamine (6.6  $\mu$ M, R-415 Molecular Probes) ont été déposés sur chaque lamelle

pendant 20 minutes. Les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS et les lamelles ont été montées sur des lames de microscope.

### **13. Statistiques ANOVA**

Nos résultats ont été comparés à l'aide d'un test de variance avec mesures répétées. Ce genre d'analyse permet l'étude de fœtus qui possèdent différentes moyennes normales du témoin. Cependant, elle nécessite une valeur pour chaque condition pour chaque fœtus. Alors, si une condition dans un essai est perdu (par erreur humaine ou par contamination) toutes les valeurs obtenues de ce même fœtus ne peuvent être utilisées dans l'analyse.

Nous avons aussi déterminé que le dénombrement des cellules dans cinq champs étaient meilleurs que seulement 3 champs et aussi efficace que 10 champs.

## RÉSULTATS

La première étape était de trouver ou d'établir un système qui nous permettrait de vérifier l'implication des COXs et des prostaglandines dans l'ostéoclastogénèse.

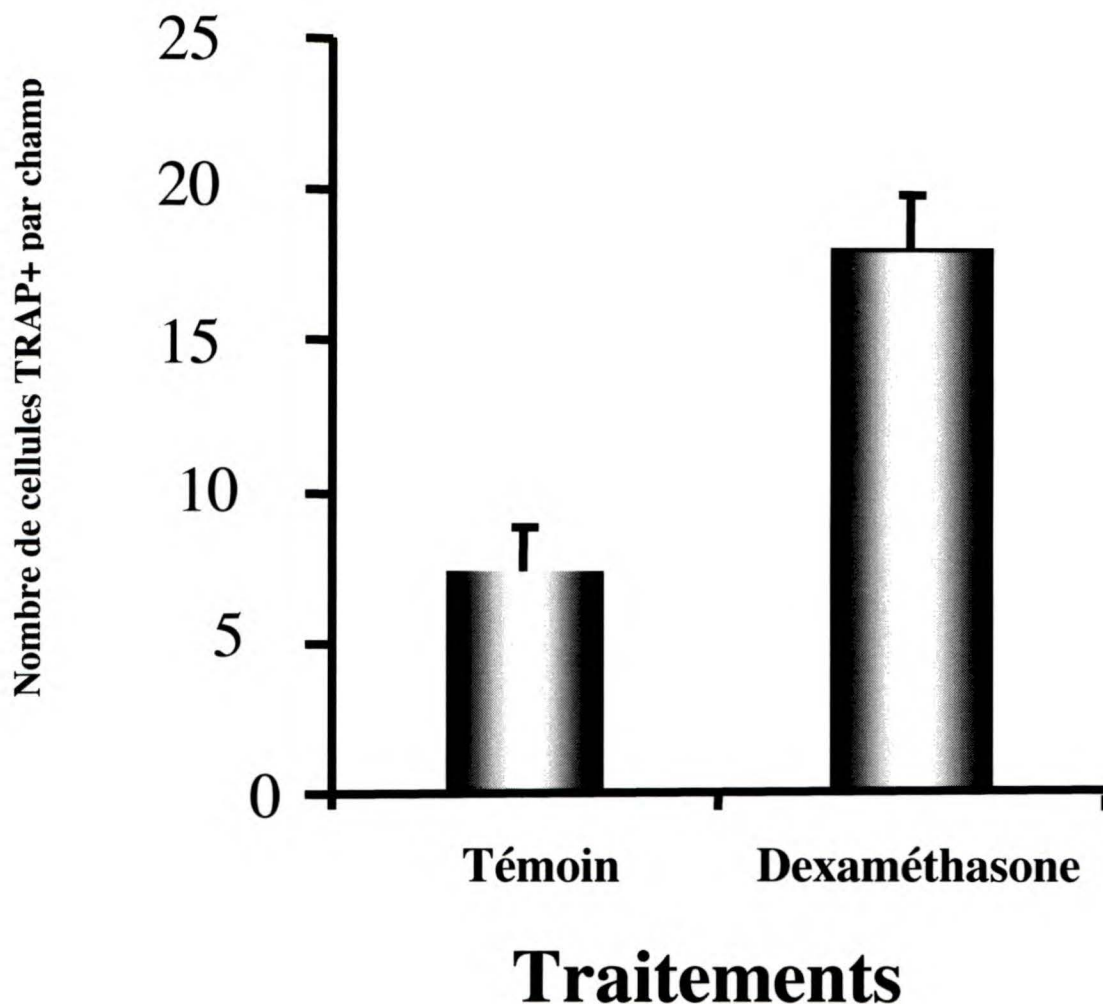
### 1. Culture de l'os dégénéré

Le protocole de culture de l'os dégénéré a produit ce que l'on recherchait au début de notre étude sur l'ostéoclastogénèse c'est-à-dire, des cellules TRAP<sup>+</sup> en quantité quantifiable dans chaque puit de culture. La dexaméthasone s'est avéré très efficace pour induire la formation de cellules TRAP<sup>+</sup> dans ce système de culture (figure 3).

À la figure 4, nous observons le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> en fonction des inhibiteurs des cyclooxygénases. L'inhibition de la COX-1 ou de la COX-2, par des inhibiteurs spécifiques valéryl salicylate et NS-398 respectivement, n'a pas eu d'effet par rapport au témoin. Cependant, l'inhibition des deux COX par un seul AINS, l'indométacine, a doublé le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport au témoin. Donc, l'absence des PGs dans ce système a aidé à la formation de cellules TRAP<sup>+</sup>. Cela indique que les COX produisaient des PGs qui inhibaient une étape importante de l'ostéoclastogénèse.

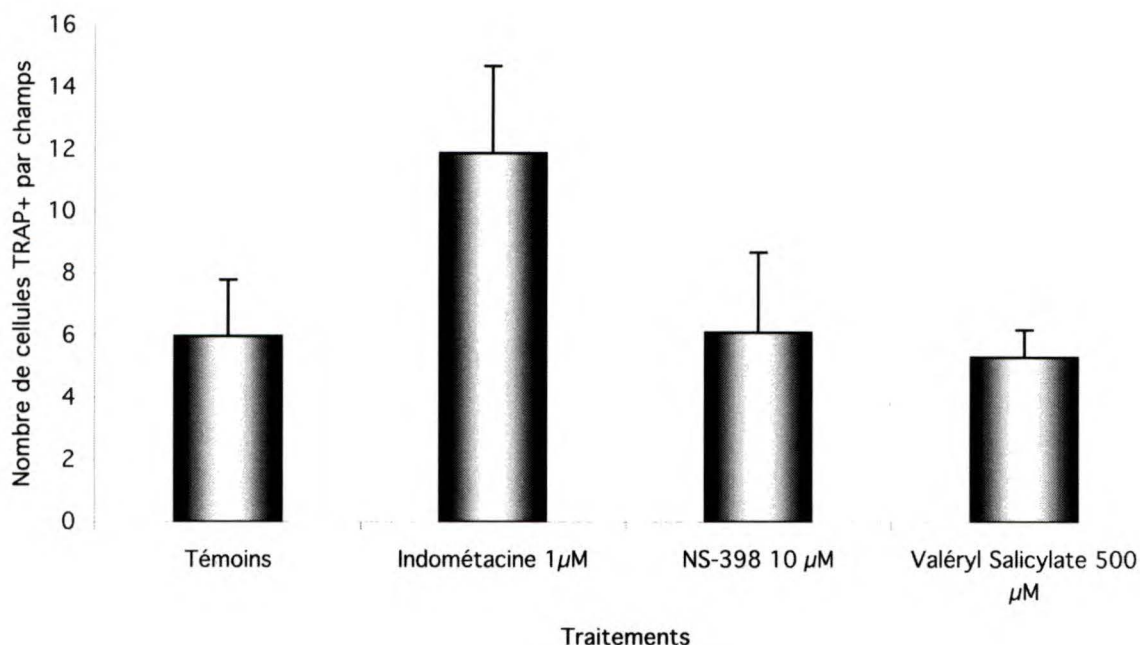
Cependant, plusieurs problèmes logistiques ne permettaient pas l'utilisation de cette méthode. Premièrement, deux projets de recherche étaient dépendants des tissus osseux fœtaux, une matière première en trop faible quantité pour deux projets. Deuxièmement, l'utilisation de la dexaméthasone empêchait la possibilité d'étudier les cyclooxygénases dans le système. Nous avons démontré précédemment que la

dexaméthasone inhibe l'expression de l'ARNm de la cyclooxygénase-2 (DE BRUM-FERNANDES *et al.*, 1994). Toutefois, si la disponibilité de la matière première devenait plus abondante, ce système pourrait être propice à l'étude des anti-inflammatoires stéroïdiens et leur implication dans l'ostéoporose induite par les glucocorticoïdes, une cause fréquente de l'ostéoporose (GIANNINI *et al.*, 2002; SAMBROOK, 2002).



**FIGURE 3** EFFETS DE LA DEXAMÉTHASONE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> AVEC LE SYSTÈME DE DÉGÉNÉRESCENCE DE L'OS FŒTAL

La dexaméthasone ( $10^{-7}$  M) est un puissant anti-inflammatoire stéroïdien. Le huitième jour, les cellules étaient fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans un champ de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). ( $\pm$  SEM, n = 3)



**FIGURE 4** EFFETS DES AINS AVEC LE PROTOCOLE DE DÉGÉNÉRESCENCE DE L'OS SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Après dégénérescence des ostéoclastes, les préparations de cellules osseuses provenant des fœtus humains (19 semaines d'âge) sont mises en culture avec les différents inhibiteurs des cyclooxygénases et la 1, 25 dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> 10<sup>-8</sup> M. L'indométacine inhibe la cyclooxygénase 1 et 2. Le NS-398 inhibe la COX-2 et le valéryl salicylate inhibe la COX-1. Les cultures ont été entretenues pendant 21 jours avec changement des milieux à tous les 3 ou 4 jours. Le jour 21 les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans un champ de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 3)

## **2. Coculture moelle osseuse humaine fœtale et ostéoblaste humain**

Pour remédier aux problèmes du système de l'os dégénéré, nous avons essayé plusieurs systèmes de coculture. Le premier était la coculture de la moelle osseuse humaine fœtale et des ostéoblastes humains. Les résultats étaient loin de satisfaire nos besoins, les cellules TRAP<sup>+</sup> étant presque non détectables. À la figure 5, on présente des images de cellules TRAP<sup>+</sup> obtenues dans cette série d'expériences. Les cellules étaient très rares et le compte des cellules TRAP<sup>+</sup> n'était pas représentatif des traitements.

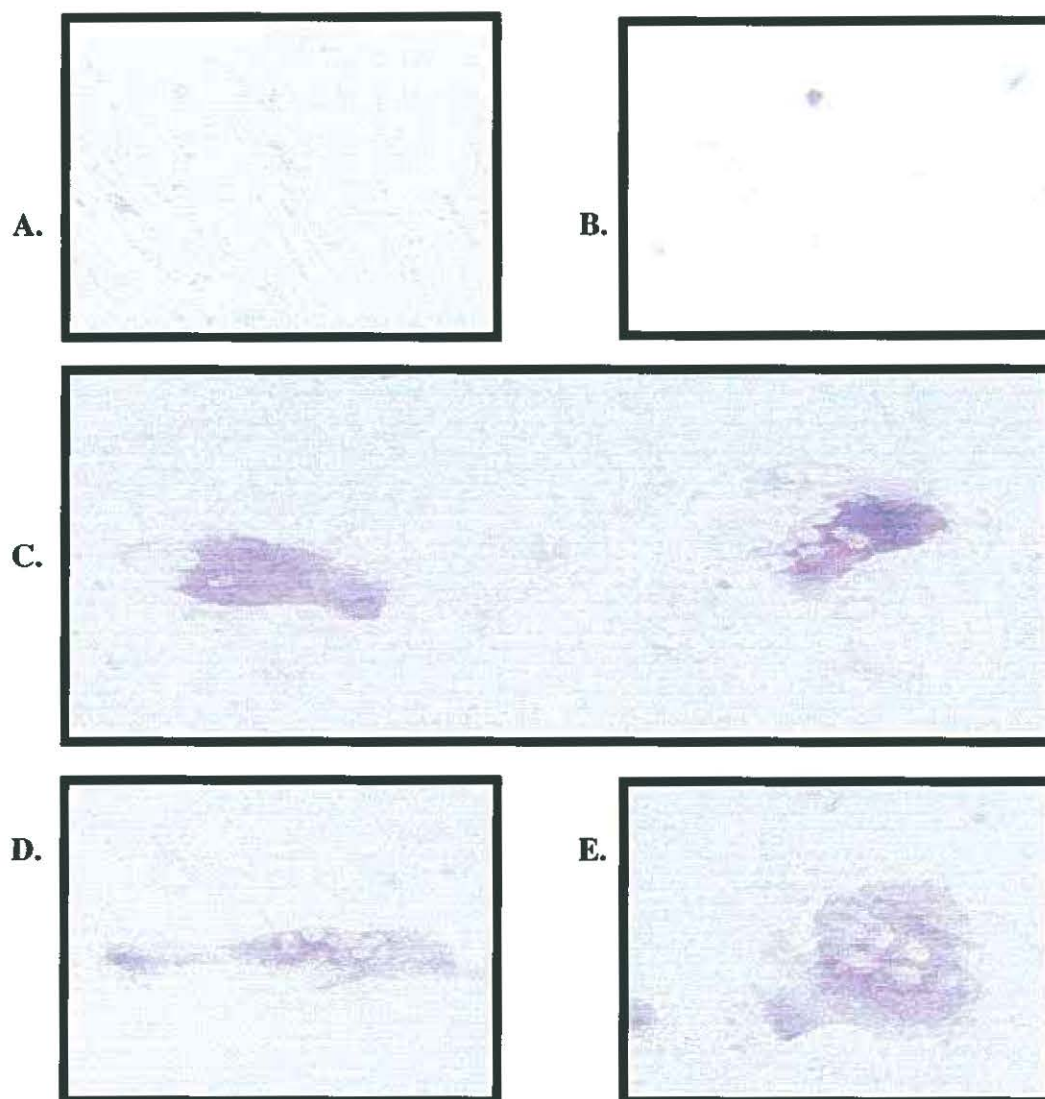
## **3. Coculture cellules de la rate humaine fœtale et SaOS-2**

Étant donné que les cellules précurseurs des monocytes se retrouvent dans la moelle et que chez les fœtus, la moelle est présente dans la rate, nous avons essayé un système de coculture de rate humaine fœtale avec une lignée d'ostéoblastes humains immortalisés, les SaOS-2.

Nos premières méthodes, avec SaOS-2 utilisaient une couche de cellules SaOS-2 stimulées avec la dexaméthasone pour augmenter l'expression du RANKL. Après trois jours, le milieu était remplacé avec un nouveau milieu contenant une suspension des cellules de la rate. Les résultats que l'on obtenait n'étaient jamais constants. Il y avait beaucoup de variation dans un même essai. Nous avons alors décidé de simplifier le système en fixant les SaOS-2 avant d'ajouter la préparation de rate contenant les précurseurs ostéoclastiques. Une fois fixées, les SaOS-2 possèdent toujours les protéines RANKL à la surface des membranes. Le RANKL est alors disponible pour les cellules avec le récepteur RANK et les composés à être étudiés ne peuvent pas agir sur les cellules SaOS-2 fixées.

À la figure 6, on présente les résultats obtenus avec ce système. Nous avons observé des augmentations du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> avec dexaméthasone, indométacine et ibuprofène. Cependant, les augmentations n'étaient pas significatives avec un N de 3 et auraient nécessité beaucoup plus de spécimen différents. De plus, le nombre de cellules obtenues de la rate fœtale était insuffisant pour la série d'expériences envisagées.





**FIGURE 5** DÉMONSTRATION DE LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> LORS DE LA COCULTURE DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE FŒTALE ET DES OSTÉOBLASTES HUMAINS

**A.** Coculture de moelle osseuse humaine fœtale et des ostéoblastes humains témoins.(100x) **B.** Coculture de moelle osseuse humaine fœtale et des ostéoblastes humains avec 1, 25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> 10<sup>-7</sup> M.(100x) **C.** Coculture de moelle osseuse humaine fœtale et des ostéoblastes humains avec NS-398 1 μM.(200x) **D.** Coculture de moelle osseuse humaine fœtale et des ostéoblastes humains avec indométacine 1 μM.(200x) **E.** Coculture de moelle osseuse humaine fœtale et des ostéoblastes humains avec valéryl salicylate 1 mM.(200x)

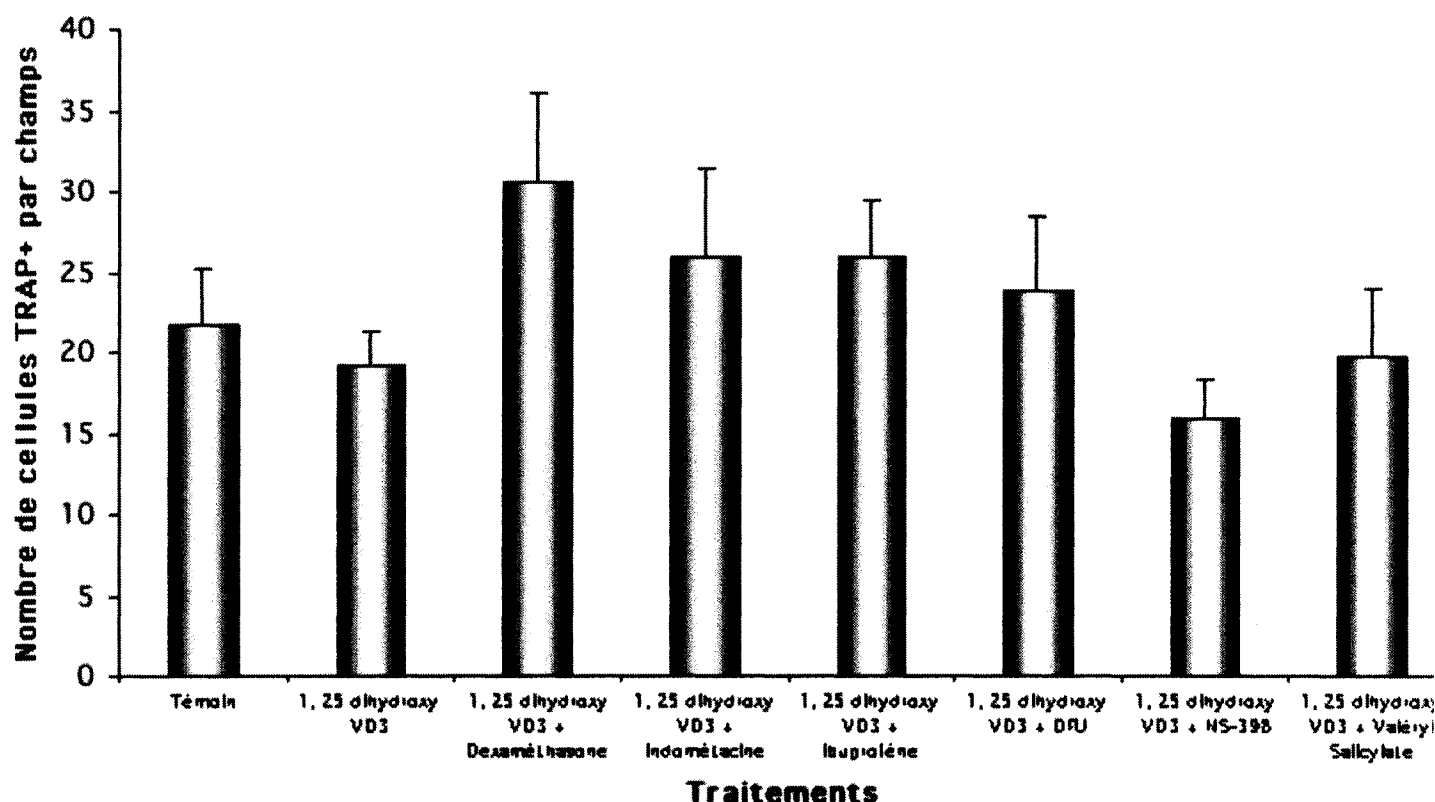


FIGURE 6 EFFETS DES AINS AVEC LE PROTOCOLE DE LA RATE HUMAINE FŒTALE AVEC SAOS-2 FIXÉ SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Essais de coculture en présence de 1, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup>M), de dexaméthasone (10<sup>-7</sup>M) et des AINS (100 μM) sur des préparations de cellules de rate fœtale (17 à 20 semaines d'âge) en culture avec SaOS-2 fixée pendant 8 jours avec un changement du milieu et des composés le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 10 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (± SEM, n = 3)

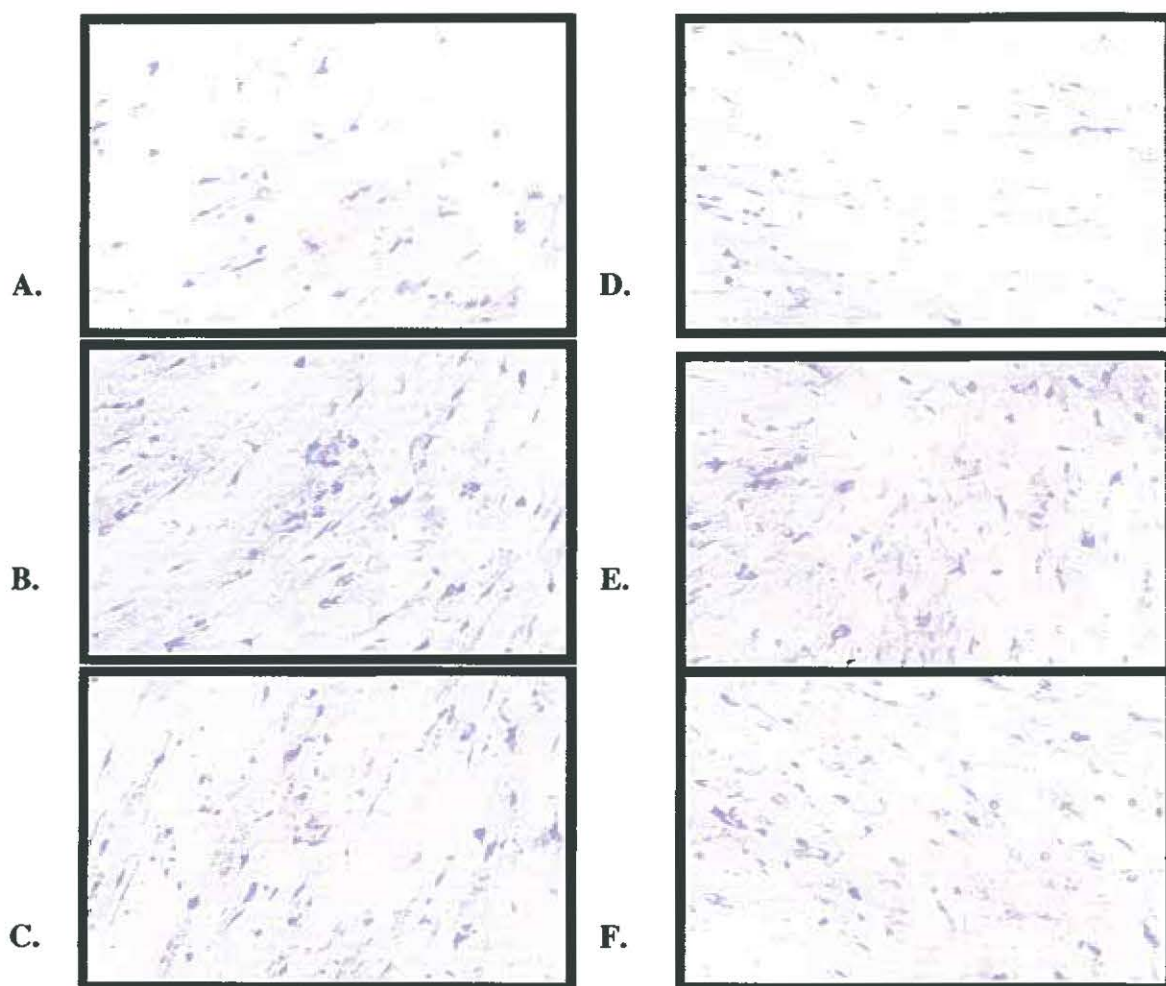
#### 4. Culture des cellules du foie humain fœtal

Nous avons déterminé que les cellules de la rate humaine fœtale étaient insuffisantes pour les projets que l'on prévoyait. Nous avons alors essayé avec un autre tissu important lors de l'hématopoïèse chez le fœtus : le foie. Avec les contrôles, nous avons déterminé que la culture de ce même tissu n'avait pas besoin de 1, 25 dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> ou de coculture avec des ostéoblastes humains ou immortalisés comme les SaOS-2. Les préparations du foie fœtal semblaient être capables de produire le nécessaire pour la différenciation vers les ostéoclastes matures.

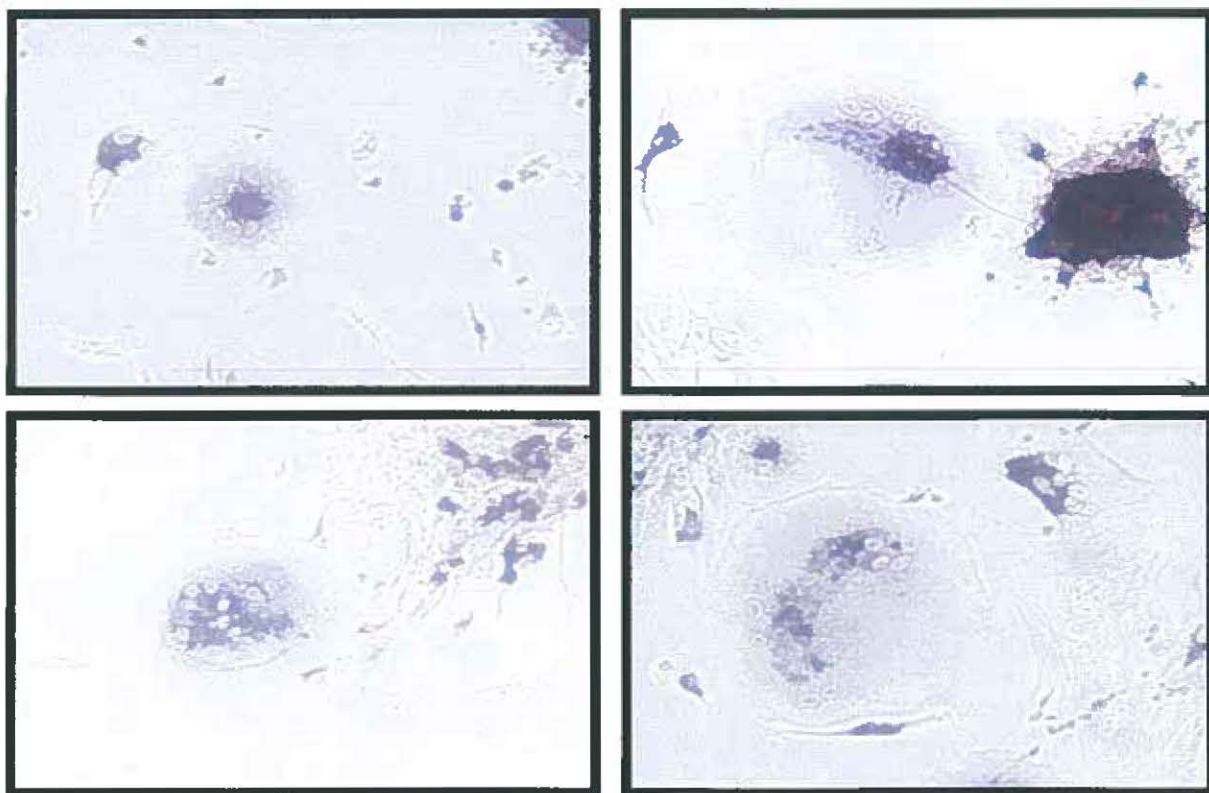
À la figure 7, on démontre la formation des cellules TRAP<sup>+</sup> lors de la culture du foie humain fœtal avec différentes conditions de culture. Nous avons observé que dans les conditions témoins, on obtenait déjà un grand nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. Ceci est idéal pour trouver des composés qui inhibent cette étape de l'ostéoclastogénèse. Nous avons alors poursuivi nos études avec des inhibiteurs de COX pour vérifier si le système était propice à notre étude. On a alors noté que les inhibiteurs des deux COX et de la COX-2 augmentaient le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> dans notre préparation alors que l'inhibiteur de la COX-1 le valéryl salicylate n'avait pas d'effet par rapport au témoin.

À la figure 8, on voit que le système permettait le développement d'immenses cellules TRAP<sup>+</sup> et multinucléées. De plus, nous avons vérifié la culture pour d'autres marqueurs d'ostéoclaste, soit le récepteur pour la calcitonine (fig. 9), le récepteur pour le récepteur RANK, le MMP-9, la beta 3 intégrine et la cathepsin K par RT-PCR (fig. 10). Nous avons noté la présence d'anhydrase carbonique II une seule fois sur trois préparations différentes par RT-PCR alors que les autres marqueurs ont toujours été présents sur les trois préparations. Il est possible que l'anhydrase carbonique II soit

seulement exprimée lors de stimulation ou lors de conditions bien spéciales telles que la résorption osseuse.

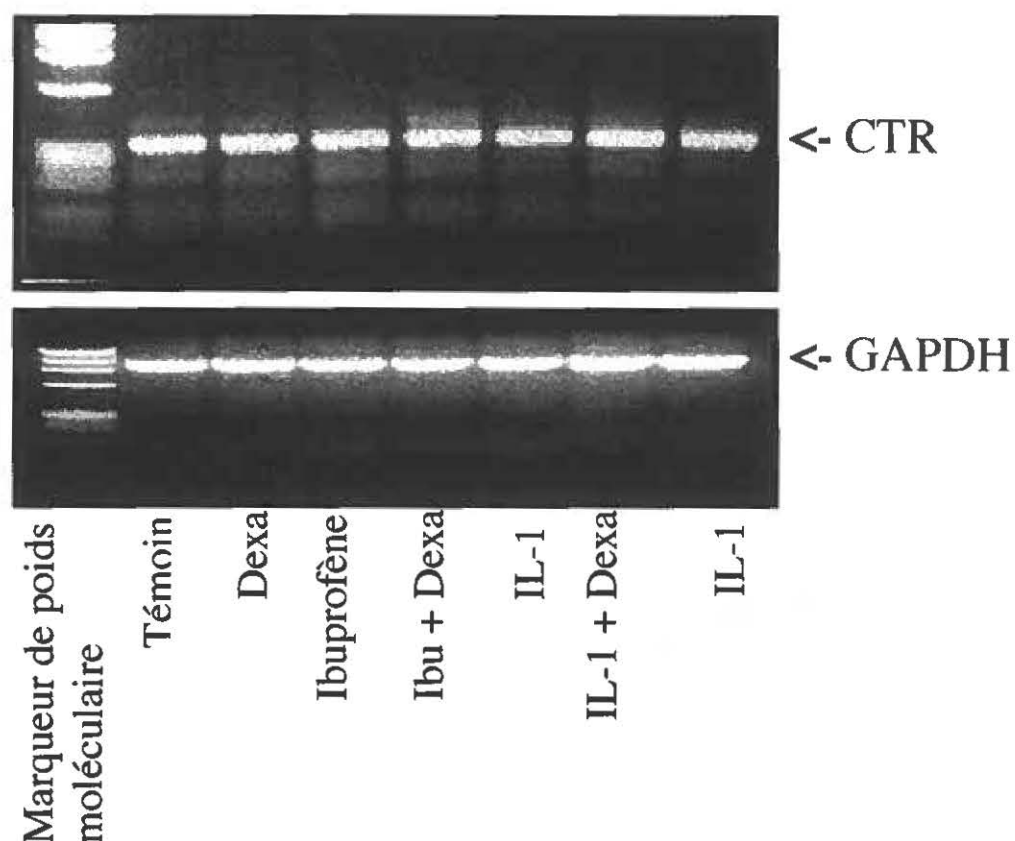


**FIGURE 7** DÉMONSTRATION DE LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> LORS DE LA CULTURE DU FOIE HUMAIN FŒTAL  
**A.** Témoin de la culture du foie humain fœtal (100x) **B.** Indométacine 100  $\mu$ M (100x) **C.** Ibuprofène 100  $\mu$ M (100x) **D.** Valéryl Salicylate 100  $\mu$ M (100x) **E.** DFU 100  $\mu$ M (100x) **F.** NS-398 100  $\mu$ M (100x).



**FIGURE 8**    EXEMPLES DE CELLULES TRAP<sup>+</sup> MULTINUCLÉÉES OBTENUES AVEC LA CULTURE DU FOIE HUMAIN FŒTAL SUR LAMELLE DE VERRE

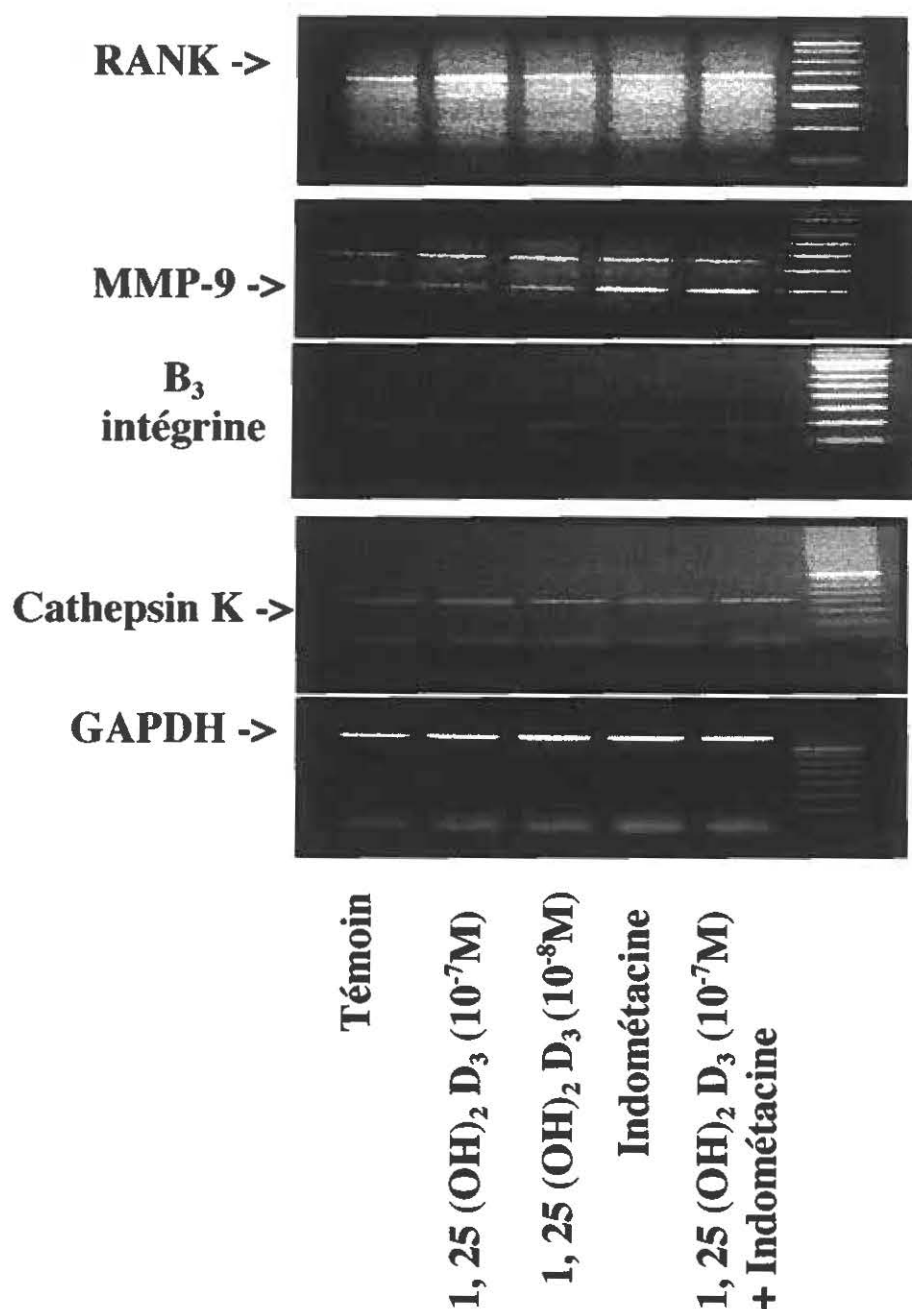
Culture du foie humain fœtal sur lamelle de verre dans des plaques à 6 puits. 400  $\mu$ l de milieux avec 100 000 cellules par ml ont délicatement recouvert la lamelle. Après 2 heures, 3 ml de milieu  $\alpha$ -MEM complet avec l'indométacine (100  $\mu$ M) ont été ajoutés. La culture a été entretenue pendant 8 jours avec un changement le quatrième jour de culture avec l'indométacine. (200x)



**FIGURE 9** RÉSULTATS DE L'ÉTUDE RT-PCR POUR LE RÉCEPTEUR À LA CALCITONINE

Culture des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) dans des pétris de 10 cm (100 000 cellules/ml, 10 ml par pétris) avec les composés à étudier : Témoin (éthanol  $1\mu\text{l}/\text{ml}$ ), dexaméthasone ( $10^{-7}\text{M}$ ), ibuprofène ( $10^{-6}\text{M}$ ), IL-1 (10 U/ml). La culture a été entretenue pendant 8 jours avec un changement du milieu de culture le quatrième jour de culture. Le jour 8, l'extraction de l'ARN total a été accomplie.





**FIGURE 10** RÉSULTATS DE L'ÉTUDE RT-PCR POUR LES MARQUEURS D'OSTÉOCLASTES OBTENUS À PARTIR DES CULTURES DU FOIE HUMAIN FŒTAL

Préparations de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture dans des pétris de 10 cm (100 000 cellules/ml, 10 ml par pétris) avec les composés à étudier : Témoin (éthanol 1 µl /ml), 1, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (10<sup>-7</sup>M ou 10<sup>-8</sup>M), Indométacine (10<sup>-6</sup>M). La culture a été entretenue pendant 8 jours avec un changement du milieu de culture le quatrième jour de culture. Le jour 8, l'extraction de l'ARN total a été accomplie.



## 5. Essais des AINS

Avec le développement du protocole de culture des cellules du foie fœtal humain, nous avons obtenu une méthode qui nous permettait d'avoir des cellules ostéoclastiques en assez grand nombre et avec une période de culture très courte (moins de 2 semaines). De plus, avec chaque foie, on pouvait préparer facilement de 4 à 6 plaques à 96 puits, ce qui nous permettait de vérifier une multitude de conditions à la fois.

La première série d'expériences servait à déterminer si les cyclooxygénases 1 ou 2 participaient à l'ostéoclastogénèse dans le système. Pour ce faire, nous avons fait une série d'expériences avec des inhibiteurs de la COX-1 et de la COX-2 tels que l'indométacine, l'ibuprofène, un inhibiteur spécifique irréversible de la COX-1, soit le valéryl salicylate et des inhibiteurs spécifiques de la COX-2 tels que le DFU et le NS-398.

L'inhibition des deux COX par l'indométacine ainsi que par l'ibuprofène a produit une augmentation du nombre de cellules qui expriment la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) en fonction de la concentration des deux anti-inflammatoires non stéroïdiens (figure 11 et figure 12). Les deux AINS ont atteint leurs effets maximaux à la concentration la plus élevée vérifiée, soit 100  $\mu\text{M}$ . Ceci étant normale puisque les  $\text{IC}_{50}$  pour la COX-1 de l'indométacine et de l'ibuprofène sont 1.67  $\mu\text{M}$  et 2.6  $\mu\text{M}$ , respectivement et les  $\text{IC}_{50}$  pour la COX-2 de l'indométacine et de l'ibuprofène sont 24.6  $\mu\text{M}$  et 1.53  $\mu\text{M}$ , respectivement. Donc, il était nécessaire d'avoir une forte concentration de ces AINS pour inhiber les 2 COX.

L'inhibition de la COX-2 par le DFU et le NS-398 a produit une augmentation du nombre de cellules qui expriment la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) en

fonction de la concentration des deux anti-inflammatoires non stéroïdiens (figure 13 et figure 14). Le DFU a atteint son effet maximal à 100 nM et a été soutenu jusqu'à 100  $\mu$ M, la concentration la plus élevée vérifiée. Le NS-398 a atteint son effet maximal à 1  $\mu$ M. Ceci démontre très bien que la COX-2 est l'enzyme responsable de la synthèse des prostaglandines qui inhibent la formation des cellules TRAP<sup>+</sup> puisque les IC<sub>50</sub> pour la COX-1 du DFU et du NS-398 sont >50  $\mu$ M et 75  $\mu$ M, respectivement et les IC<sub>50</sub> pour la COX-2 du DFU et du NS-398 sont 0.041  $\mu$ M et 1.77  $\mu$ M, respectivement. Donc, la forte augmentation des cellules TRAP<sup>+</sup> observé coïncide très bien avec l'inhibition de la COX-2.

L'inhibition de la COX-1 par le valéryl salicylate, un inhibiteur irréversible de la COX-1 très spécifique, n'a produit qu'une légère augmentation du nombre de cellules qui expriment la phosphatase acide résistante aux tartrates à partir de la concentration 1 nM à 100  $\mu$ M sans jamais devenir significative (figure 15).

Ces résultats indiquent que l'inhibition des cyclooxygénases a favorisé la formation des cellules TRAP<sup>+</sup> dans notre modèle de culture. De plus, avec l'aide des AINS spécifiques, nous avons déterminé que l'inhibition de la COX-2 était l'isoenzyme majoritairement responsable de cette augmentation.

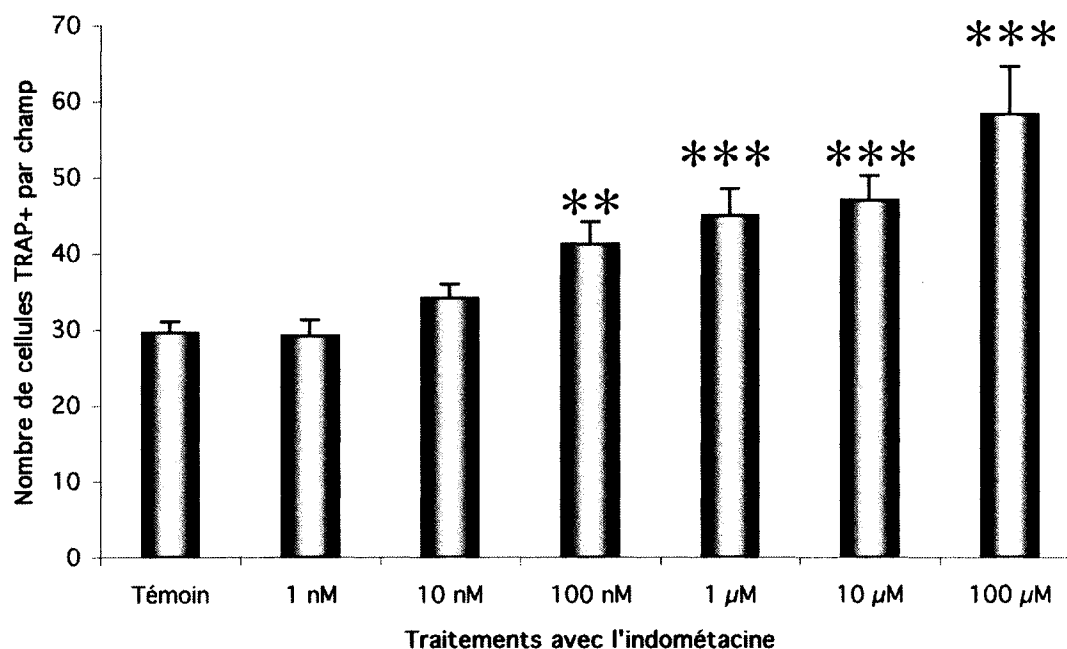
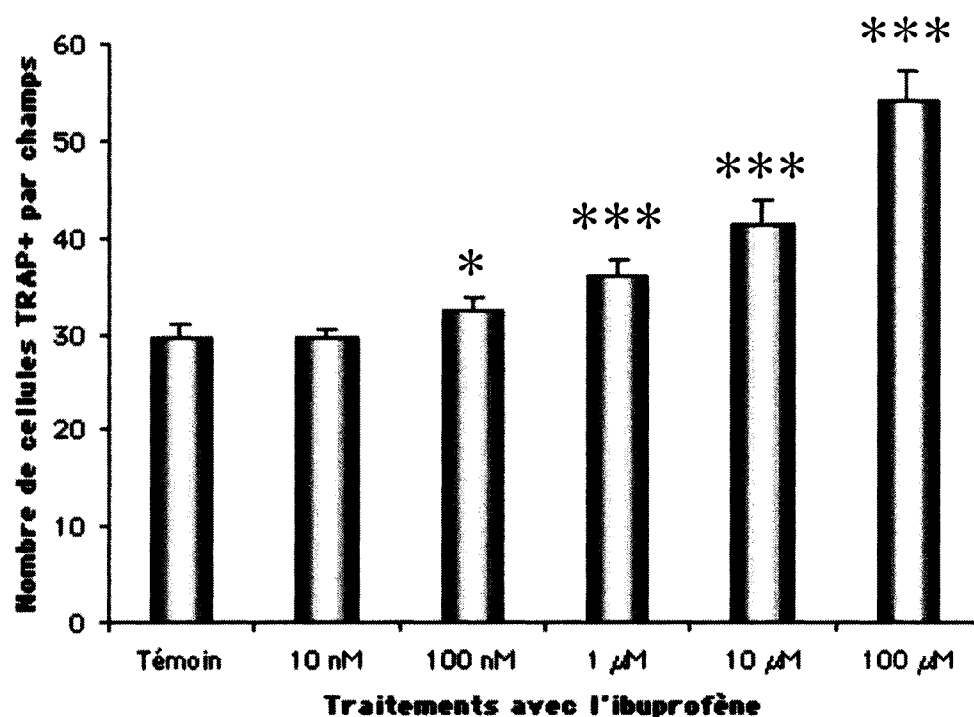


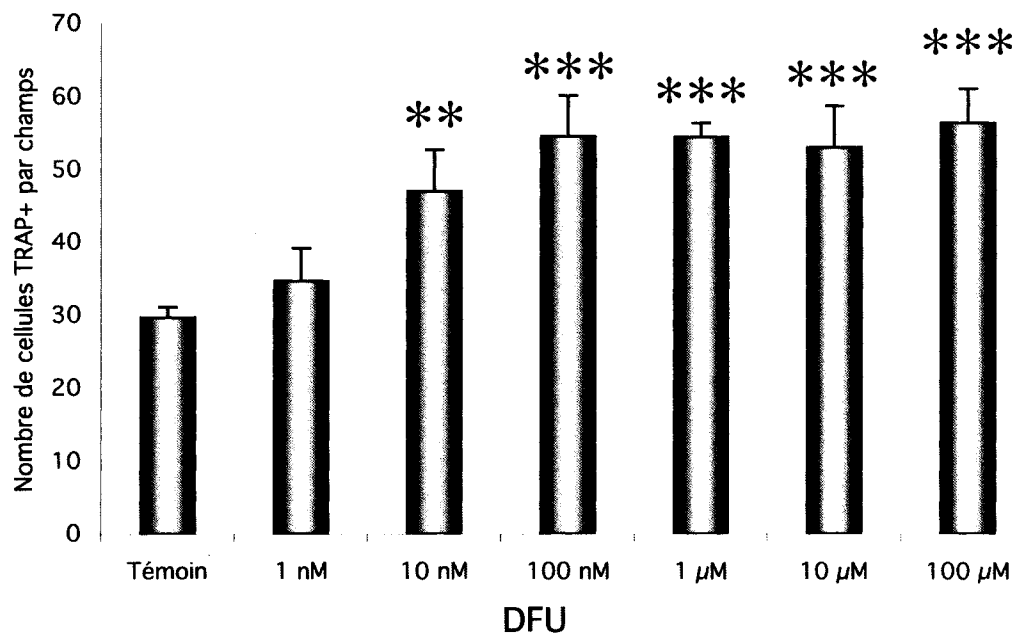
FIGURE11 EFFET DE L'INDOMÉTACINE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'AINS le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). ( $\pm$  SEM, n = 6, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 par rapport au Témoin)

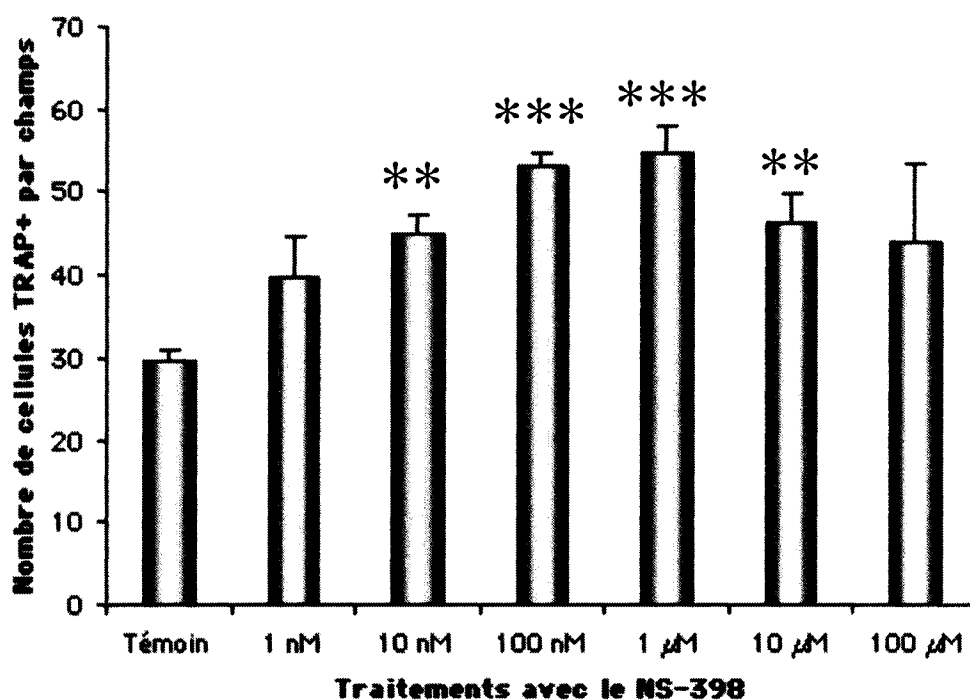


**FIGURE 12** EFFET DE L'IBUPROFÈNE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'ibuprofène sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'AINS le quatrième jour. Au huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (± SEM, n = 6, \* P< 0.05, \*\*\* P< 0.001 par rapport au Témoin)



**FIGURE 13** EFFET DU DFU SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>  
 Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 2 par le DFU sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'AINS le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (± SEM, n = 4, \*\* P< 0.01, \*\*\* P< 0.001 par rapport au Témoin)



**FIGURE 14** EFFET DU NS-398 SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>  
 Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 2 par le NS-398 sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'AINS le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (± SEM, n = 4, \*\* P< 0.01, \*\*\* P< 0.001 par rapport au Témoin)

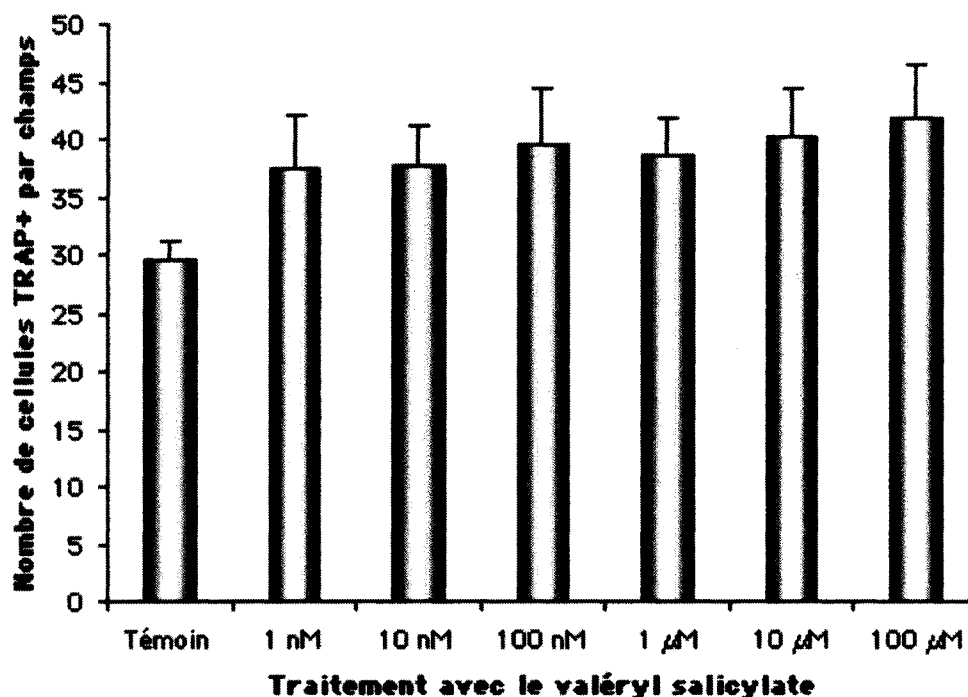


FIGURE 15 EFFET DU VALÉRYL SALICYLATE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 par le valéryl salicylate sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'AINS le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (± SEM, n = 4)

## 6. Détermination des récepteurs impliqués lors de l'ostéoclastogénèse

Ayant déterminé que l'inhibition des cyclooxygénases, plus spécifiquement la COX-2, augmentait le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>, nous avons vérifié si l'addition des prostaglandines dans le système amenait un retour à la normale, soit un résultat semblable au témoin. Si ceci était démontré, nous allions devoir déterminer quels étaient les récepteurs aux prostaglandines qui étaient responsables de ce résultat. Il était important d'inhiber la production des prostaglandines pour plusieurs jours sans le renouvellement des milieux de culture, alors nous avons utilisé l'indométacine à 100  $\mu\text{M}$ , environ 5x l'IC<sub>50</sub> de la COX-2 et 50x l'IC<sub>50</sub> de la COX-1. De plus, l'effet sur le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> était maximal à cette concentration ce qui nous permet de mieux évaluer les effets des prostaglandines dans les séries d'expériences à suivre.

### 6.1 Étude du récepteur DP

L'agoniste de préférence pour le récepteur DP est le BW245C. La première expérience avait pour but de déterminer si le BW245C était capable de ramener le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine au niveau du témoin. Le BW245C à 1  $\mu\text{M}$  a causé une légère diminution, mais non significative par rapport à l'indométacine seule (figure 16). Nous avons alors poursuivi l'étude avec une courbe de concentration du BW245C. Nous avons observé que cette diminution était maximale à 1  $\mu\text{M}$  (figure 17). Ces résultats ont démontré que le récepteur DP, à lui seul, ne pouvait empêcher l'augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine.



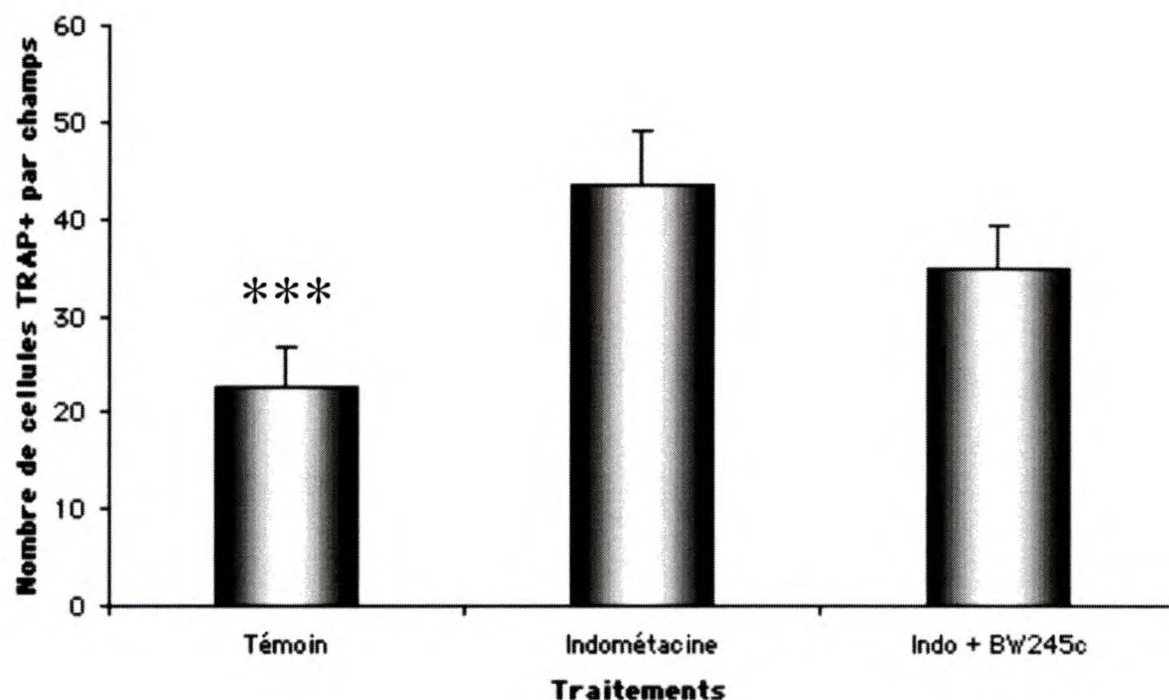


FIGURE 16 EFFET DU BW245C SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M) avec l'addition du BW245C (1  $\mu$ M), agoniste du récepteur DP, sur des préparations de cellules de foie foetal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'indométacine et le BW245C le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 3, \*\*\* P< 0.001 par rapport à indométacine 100 $\mu$ M)

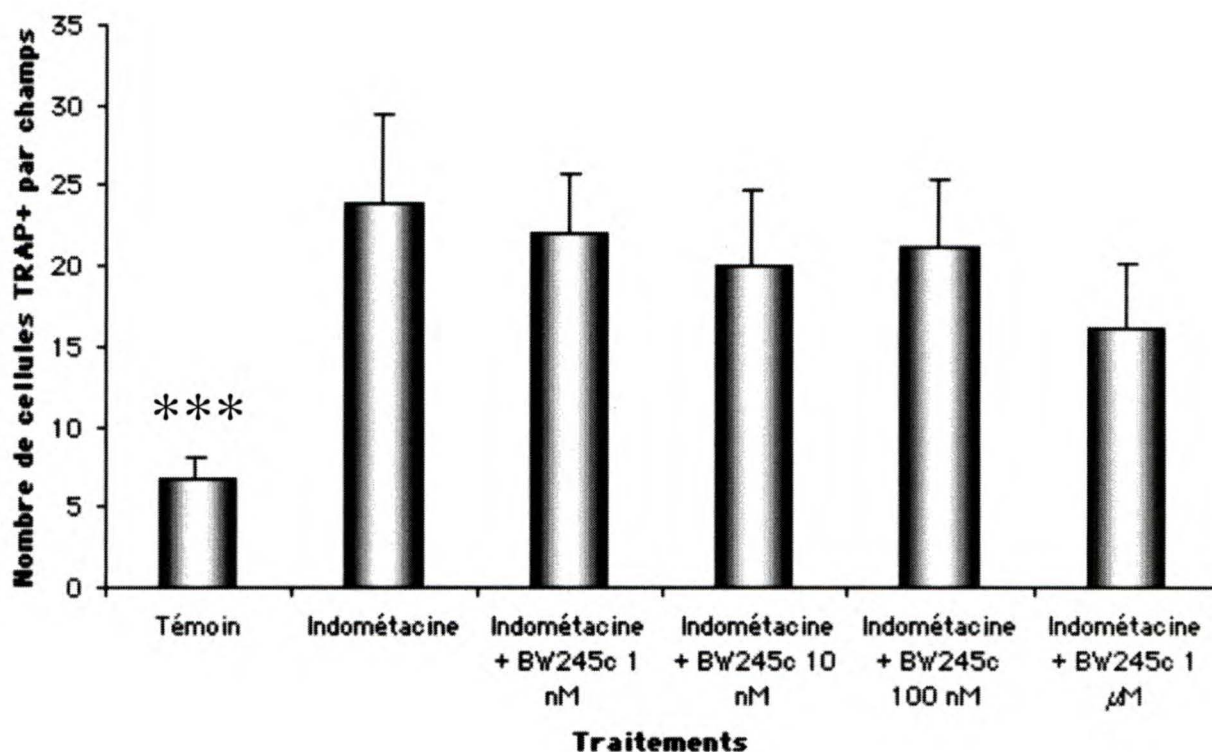


FIGURE 17 EFFET DU BW245C SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine ( $10^{-4}$ M) avec l'addition du BW245C, agoniste du récepteur DP, à différentes concentrations sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec un changement du milieu avec l'indométacine et le BW245C le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \*\*\* P< 0.001 par rapport à indométacine 100  $\mu$ M)

## 6.2 Étude des récepteurs EP

Il existe plusieurs sous-types de récepteurs EP soit : EP1, EP2, EP3 et EP4. Des agonistes spécifiques pour chacun de ces récepteurs n'étaient pas encore disponibles lors du début de cette étude. Nous avons alors procédé à notre analyse avec plusieurs agonistes pour déterminer le ou les récepteur(s) EP impliqué(s) dans l'ostéoclastogénèse. La première expérience consistait à déterminer si un des agonistes était capable de faire retourner le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine au niveau du témoin. La prostaglandine E<sub>2</sub>, agoniste pour tous les récepteurs EP, à une concentration de 1  $\mu$ M, a causé une forte diminution du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport à l'indométacine seule (figure 18). Puisque, nous avons démontré qu'un ou plusieurs des récepteurs EP étaient impliqués, nous avons alors poursuivi l'étude avec le 17-phényl trinor PGE<sub>2</sub>, un agoniste EP1 avec une petite action sur le récepteur EP3. Les résultats ont démontré que le récepteur EP1 participait à la diminution du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine (figure 18). L'agoniste suivant, le butaprost qui est spécifique au récepteur EP2, n'a pas eu d'effet sur l'augmentation induite par l'indométacine (figure 18). L'agoniste sulprostone, sélectif pour EP3, tout en étant capable d'avoir des actions sur le récepteur EP1, n'a eu aucun effet sur l'augmentation induite par l'indométacine (figure 18). Finalement, l'agoniste 11 déoxy PGE<sub>1</sub>, sélectif pour les récepteurs EP2 et EP4, a eu un effet aussi puissant que celui de la PGE<sub>2</sub> pour empêcher l'augmentation des cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine (figure 18). Nous avons alors conclu que EP1 et EP4, pouvaient à eux seuls, faire retourner l'augmentation induite par l'inhibition des COX par l'indométacine au niveau du témoin. Toutefois, il n'était pas clair que le 11

déoxy prostaglandine  $E_1$  avait eu son effet directement par le récepteur EP4. Il se pouvait que l'effet soit dû à la costimulation des récepteurs EP2 et EP4.

Nous avons produit des graphiques avec des concentrations variantes pour les 3 agonistes les plus intéressants, soit  $PGE_2$  (figure 19), 11 déoxy  $PGE_1$  (figure 20) et 17-phényl trinor  $PGE_2$  (figure 21). La  $PGE_2$  et le 11 déoxy  $PGE_1$  ont produit des courbes dose-dépendantes alors que le 17-phényl trinor  $PGE_2$  n'a eu une activité significative qu'à  $1 \mu M$ .

### 6.2.1 Étude avec les antagonistes des récepteurs EP

Ayant démontré que la stimulation de différents récepteurs EP empêchait l'augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> en présence de l'indométacine, nous avons l'occasion de déterminer lequel ou lesquels des récepteurs étaient activés dans les conditions de culture du témoin. Alors, une culture avec des antagonistes des récepteurs impliqués devait simuler l'effet de l'indométacine, soit augmenter le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> dans la préparation. L'expérience a été faite avec le SC19220, AH6809 et le AH23848B, trois antagonistes des récepteurs EP (figure 22), en absence d'indométacine.

Le SC 19220 ( $30 \mu M$ ), un antagoniste spécifique du récepteur EP1, n'a pas eu d'effet sur le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport au témoin (figure 22). Cela était une indication que le blocage de EP1, à lui seul, n'empêchait pas l'inhibition de la formation de cellules TRAP<sup>+</sup> dans la préparation.

Le AH 6809 ( $10 \mu M$ ), un antagoniste sélectif des récepteurs EP1 et EP2, a augmenté le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport au témoin (figure 22). Cela indiquait que le blocage de EP1 et EP2 empêchait l'inhibition endogène de la formation de cellules TRAP<sup>+</sup> dans la préparation, quoique cette inhibition était partielle.

Le AH 23848B, un antagoniste spécifique du récepteur EP4, a augmenté le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport au témoin presque aussi bien que l'indométacine (figure 22). Ce résultat démontre que le récepteur EP4 était très important pour l'inhibition de la formation de cellules TRAP<sup>+</sup> endogène dans la préparation. Avec l'antagoniste AH23848B du récepteur EP4, on obtenait une formation de cellules TRAP<sup>+</sup> meilleure que lorsqu'on antagonisait EP2.

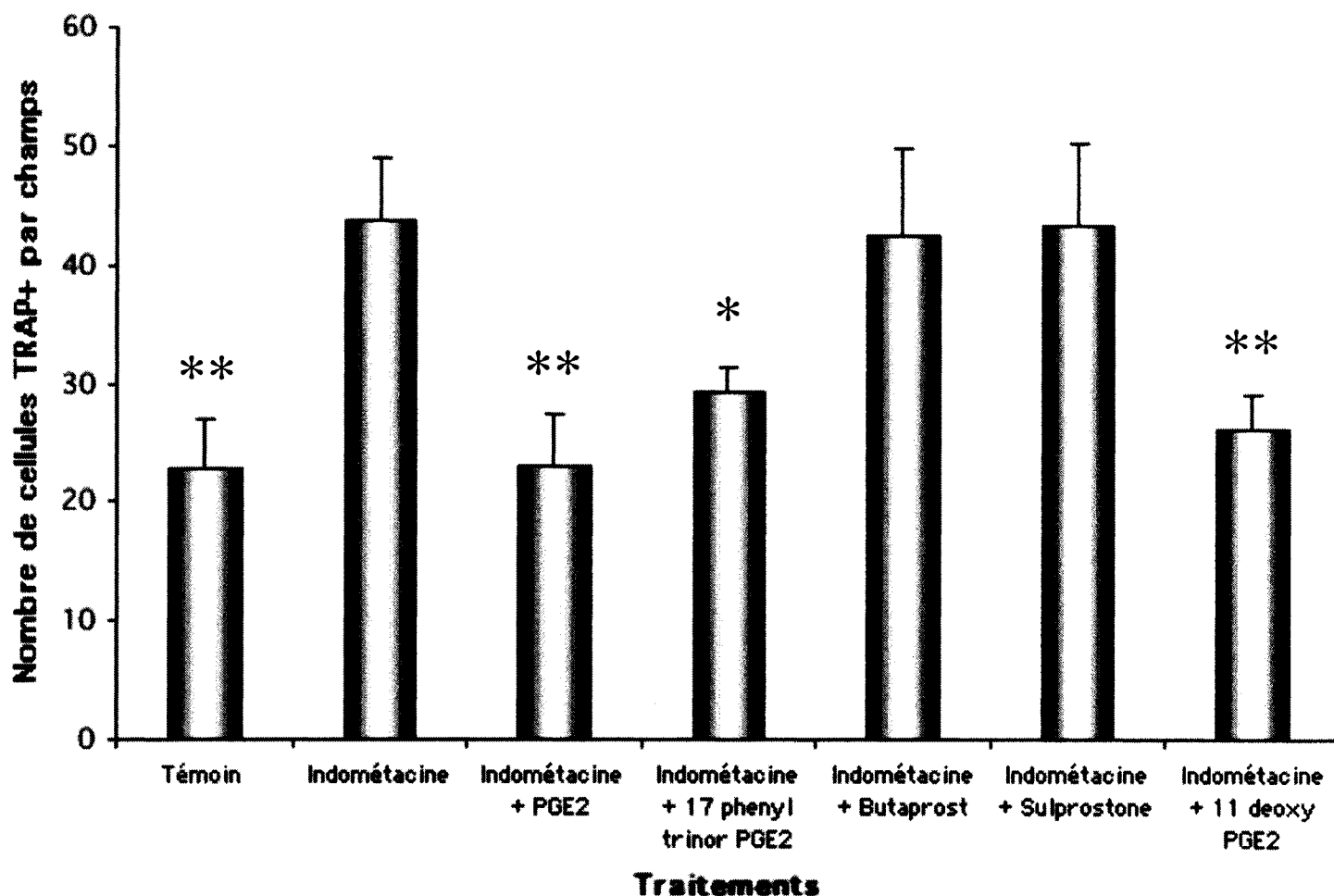


FIGURE 18 EFFET DES AGONISTES EP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITES PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M) avec l'addition de différents agonistes (1  $\mu$ M) des récepteurs EP sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu avec les composés le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 3, \* P< 0.05, \*\* P< 0.01 par rapport à indométacine 100  $\mu$ M)

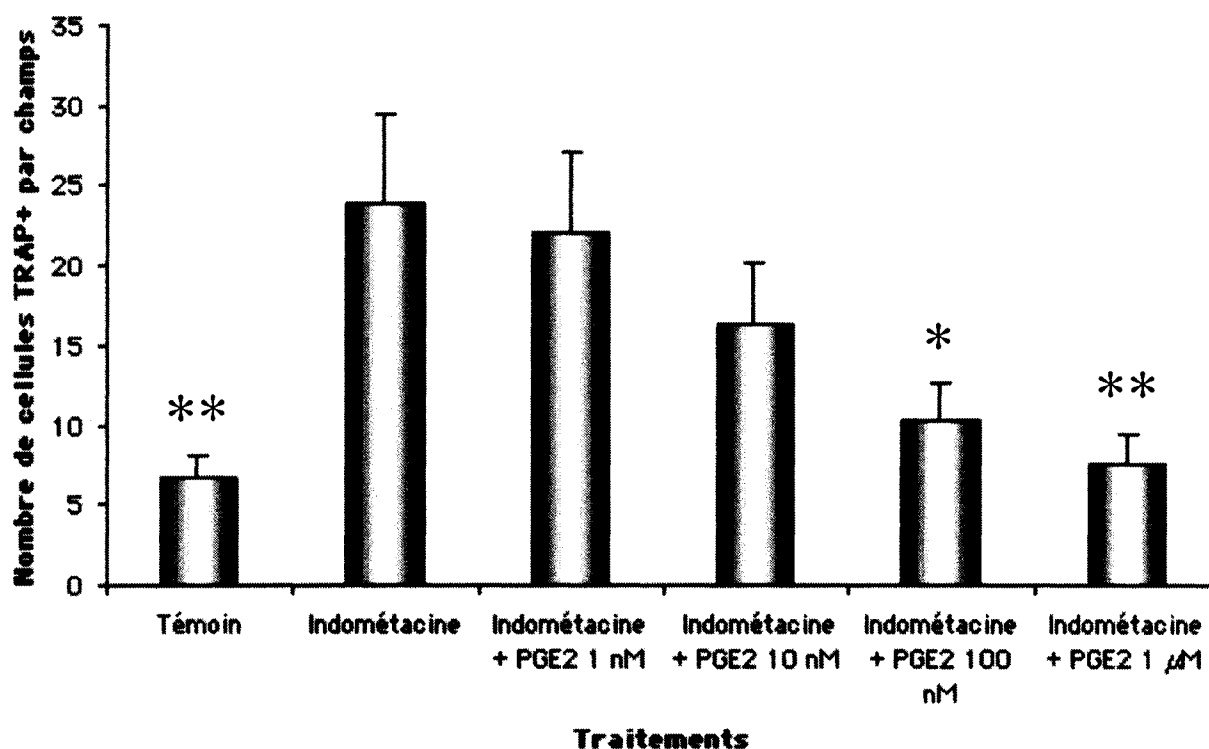
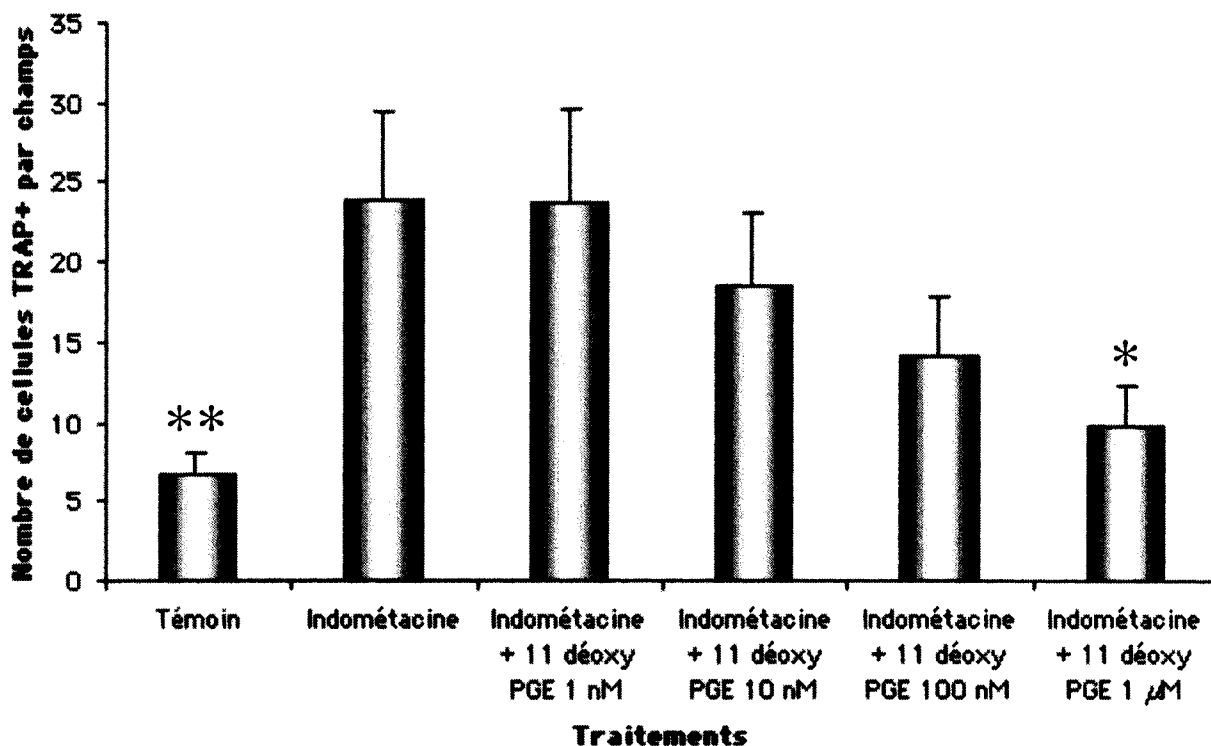


FIGURE 19 EFFET DE LA PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub> SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine avec l'addition de la prostaglandine PGE<sub>2</sub>, agoniste des récepteurs EP1, EP2, EP3 et EP4, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu avec l'indométacine et la PGE<sub>2</sub> le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 par rapport à indométacine 100 µM)



**FIGURE 20** EFFET DU 11 DÉOXY PGE<sub>1</sub> SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100 µM) avec l'addition du 11 déoxy PGE<sub>1</sub>, agoniste des récepteurs EP2, EP3 et EP4, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu avec indométacine et 11 déoxy PGE<sub>1</sub> le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \* P< 0.05, \*\* P< 0.01 par rapport à indométacine 100 µM)



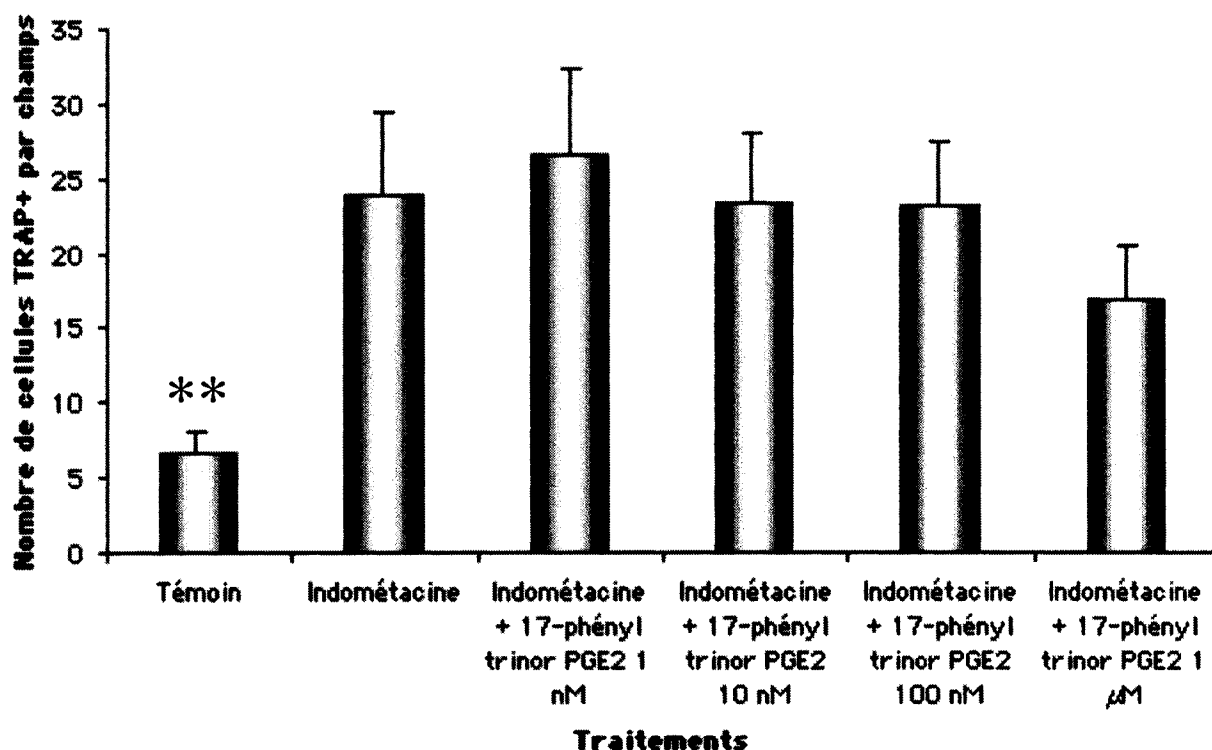


FIGURE 21 EFFET DU 17-PHÉNYL TRINOR PROSTAGLANDINE E<sub>2</sub> SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100 µM) avec l'addition du 17-phényl trinor prostaglandine E<sub>2</sub>, agoniste des récepteurs EP1 et EP3, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) pendant 8 jours avec changement du milieu le quatrième jour. Le huitième jour les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \*\* P< 0.01 par rapport à indométacine 100µM)

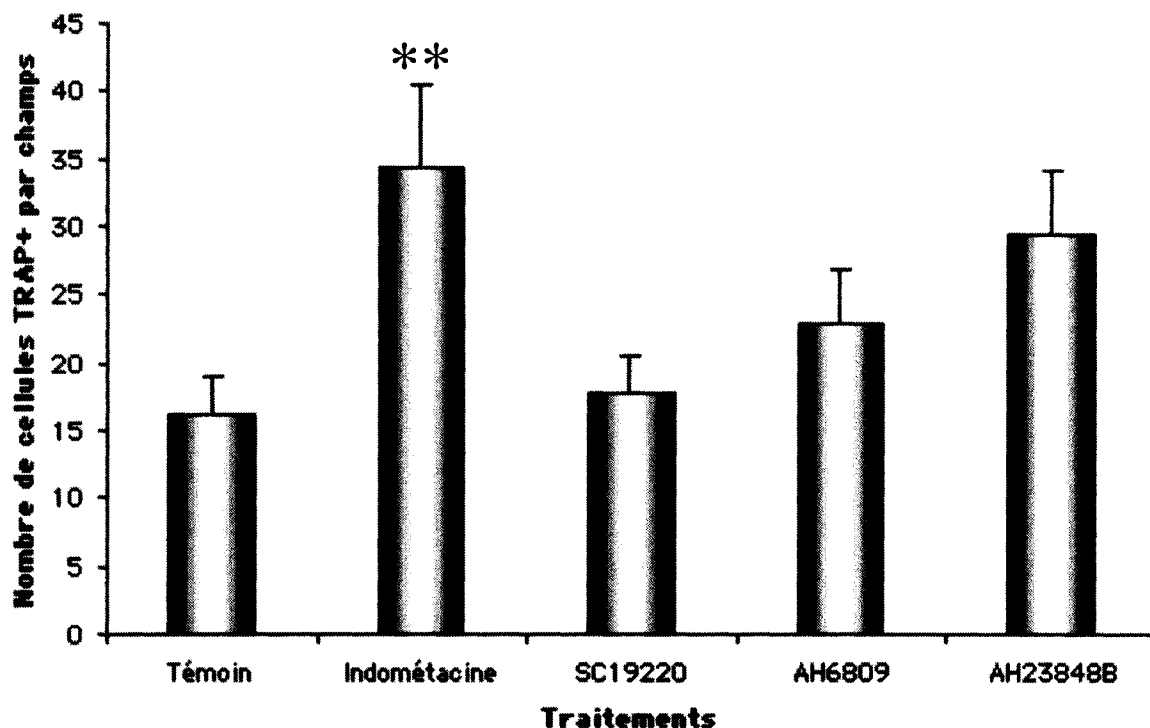


FIGURE 22 EFFETS DES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS EP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

L'antagoniste SC19220 (30  $\mu$ M) bloque le récepteur EP1. L'antagoniste AH6809 (10  $\mu$ M) inhibe le récepteur EP1 et EP2. Le AH23848B (30  $\mu$ M) antagonise le récepteur EP4. Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des composés à étudier pendant 8 jours avec un changement du milieu et des antagonistes le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \*\* P< 0.01 par rapport au témoin)

### 6.3 Étude du récepteur FP

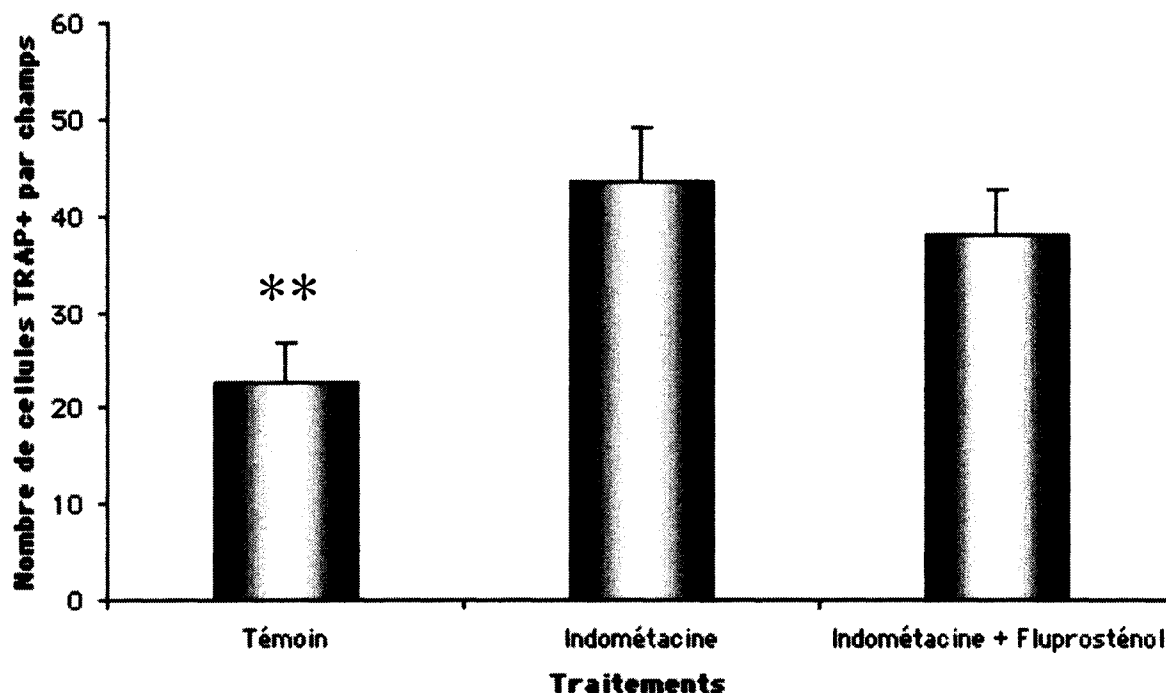
Il existe plusieurs agonistes sélectifs pour le récepteur FP. Par contre, nous avons choisi le fluprosthénol qui est un analogue métaboliquement stable de la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  et un agoniste très puissant du récepteur FP (ABRAMOVITZ *et al.*, 1994; LAKE *et al.*, 1994).

La première expérience avait pour but de déterminer si le fluprosthénol était capable de faire retourner le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induite par l'indométacine au niveau du témoin. Le fluprosthénol (1  $\mu$ M) a causé une petite diminution par rapport à l'indométacine seule, mais cette diminution n'était pas significative (figure 23). Nous avons alors poursuivi l'étude avec une courbe de concentration du fluprosthénol pour confirmer le résultat précédent (figure 24). Nous avons observé que cette diminution était maximale à 10 nM mais jamais significative. Ces résultats démontraient que le récepteur FP, à lui seul, ne pouvait empêcher l'augmentation du nombre des cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine.

#### 6.3.1 Étude avec les antagonistes des récepteurs FP

Quoique le fluprosthénol était incapable d'empêcher l'augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine, il était toujours possible que le récepteur FP participe à l'inhibition de la formation des cellules TRAP<sup>+</sup> dans les conditions du témoin. Les antagonistes  $PGF_{2\alpha}$  diméthyl amide et  $PGF_{2\alpha}$  diméthyl amine bloquent le récepteur FP et allaient nous permettre de déterminer si le récepteur FP participait à l'inhibition de cette étape de l'ostéoclastogénèse.

Les résultats obtenus avec les antagonistes du récepteur FP, soit le  $\text{PGF2}\alpha$  diméthyl amide et  $\text{PGF2}\alpha$  diméthyl amine, témoignent de l'inefficacité de ces produits à augmenter le nombre de cellules  $\text{TRAP}^+$  par rapport au témoin (figure 25). En conclusion, le récepteur FP n'a eu aucune activité sur le nombre de cellules  $\text{TRAP}^+$  dans notre système.



**FIGURE 23** EFFET DU FLUPROSTÉNOLE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine ( $10^{-4}$ M) avec l'addition du fluprosthénol ( $10^{-6}$ M), agoniste du récepteur FP, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu avec l'indométacine et le fluprosthénol le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 3, \*\* P < 0.01 par rapport à indométacine 100  $\mu$ M)

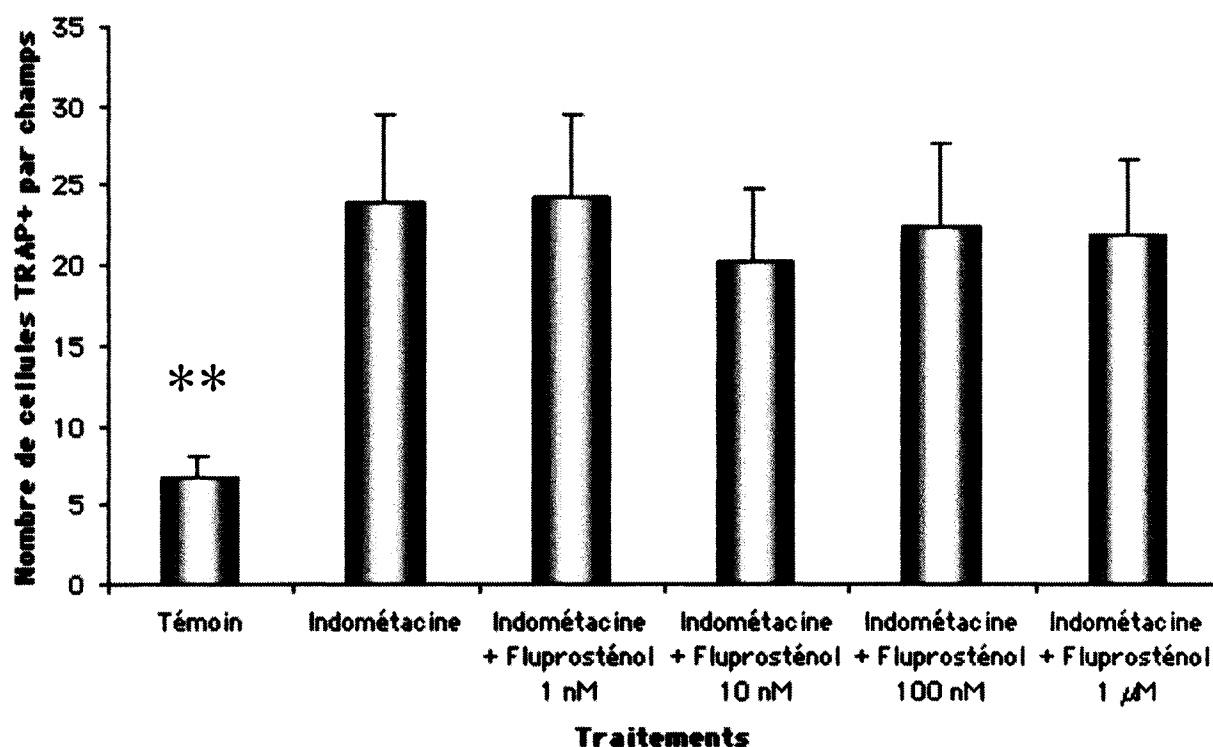


FIGURE 24 EFFET DU FLUPROSTÉNOLE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100 µM) avec l'addition du fluprosthénol, agoniste du récepteur FP, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu avec l'indométacine et le fluprosthénol le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \*\* P< 0.01)

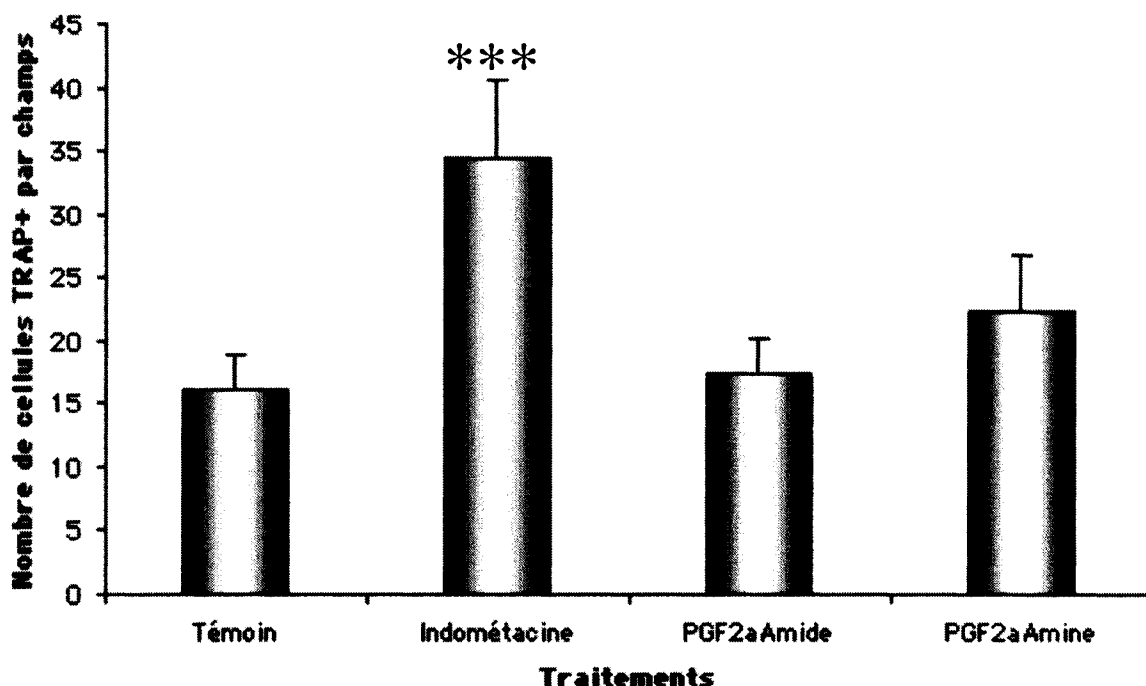


FIGURE 25 EFFETS DES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS FP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M). Les antagonistes PGF2 $\alpha$  diméthyl amide (30  $\mu$ M) et PGF2 $\alpha$  diméthyl amine (30  $\mu$ M) bloquent le récepteur FP. Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des composés à étudier pendant 8 jours avec changement du milieu avec les composés étudiés le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 6, \*\*\* P< 0.001)

#### **6.4 Étude du récepteur IP**

Il existe plusieurs agonistes sélectifs pour le récepteur IP. Nous avons choisi la carbaprostacycline, un analogue métaboliquement stable de la prostaglandine I<sub>2</sub>.

La première expérience visait à déterminer si la carbaprostacycline était capable de faire retourner le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine au niveau du témoin. La carbaprostacycline (1  $\mu$ M) n'a pas eu d'effet par rapport à l'indométacine seule (figure 26). Ces résultats démontrent que le récepteur IP, à lui seul, n'a pu empêcher l'augmentation du nombre des cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'indométacine.



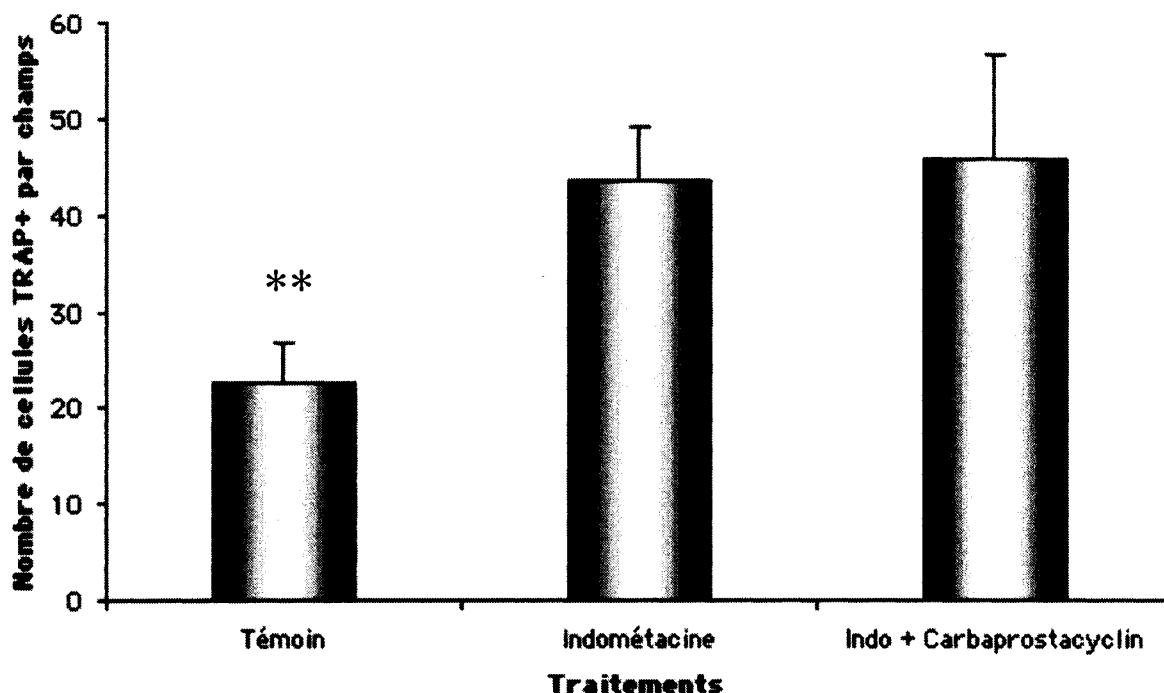


FIGURE 26 EFFET DE LA CARBAPROSTACYCLINE SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M) avec l'addition de la carbaprostacycline (1  $\mu$ M), agoniste du récepteur IP, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu contenant l'indométacine et la carbaprostacycline le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 3, \*\* P < 0.01 par rapport à indométacine 100  $\mu$ M)

## 6.5 Étude des récepteurs TP

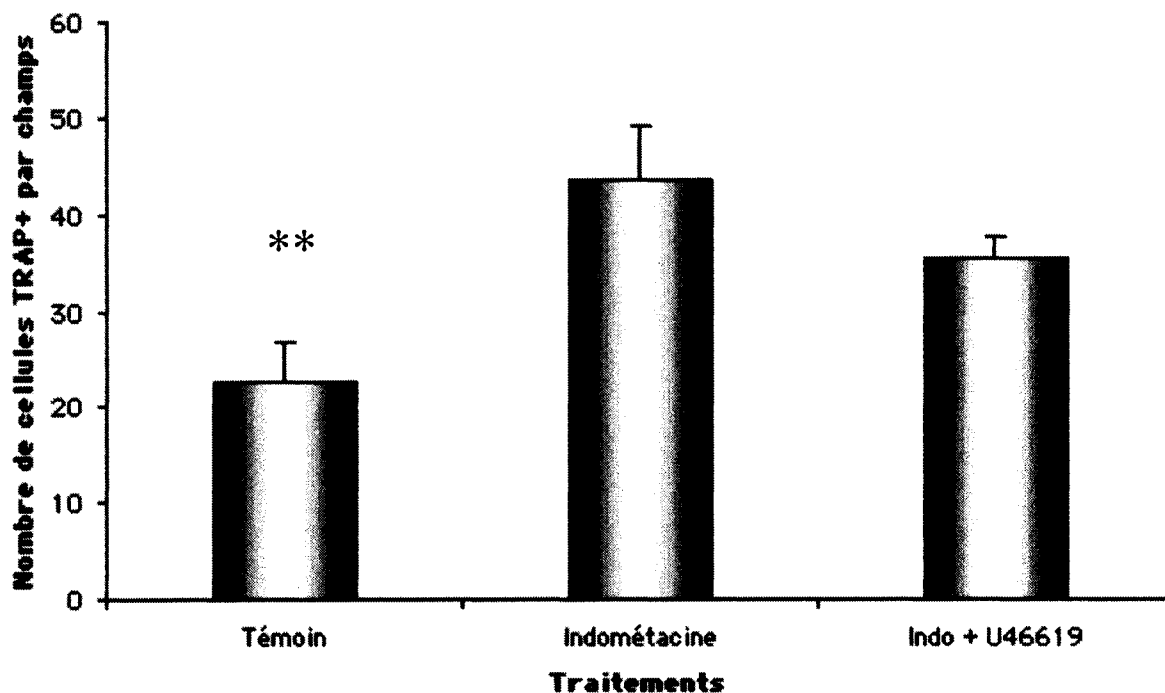
Il existe plusieurs agonistes sélectifs pour les récepteurs TP. Nous avons choisi le U46619, un analogue métaboliquement stable de l'endoperoxide  $\text{PGH}_2$  et un agoniste des récepteurs TP (COLEMAN *et al.*, 1981; LIEL *et al.*, 1987).

La première expérience consistait à déterminer si le U46619 était capable de ramener le nombre de cellules  $\text{TRAP}^+$  induite par l'indométacine au niveau du témoin. Le U46619 (1  $\mu\text{M}$ ) a engendré une petite diminution par rapport à l'indométacine seule, mais cette diminution n'était pas significative (figure 27). Nous avons alors poursuivi l'étude avec une courbe de concentration du U46619. Nous avons observé que cette diminution était maximale à 10 nM et continuait jusqu'à 1  $\mu\text{M}$  (figure 28). Ces résultats démontrent que les récepteurs TP, à eux seuls, empêchaient partiellement l'augmentation du nombre des cellules  $\text{TRAP}^+$  induites par l'indométacine.

### 6.5.1 Étude avec les antagonistes des récepteurs TP

Quoique le U46619 inhibait partiellement à l'augmentation du nombre de cellules  $\text{TRAP}^+$  induite par l'indométacine, il était toujours possible que le récepteur TP ne participe pas à l'inhibition de la formation des cellules  $\text{TRAP}^+$  dans les conditions du témoin. L'antagoniste SQ 29548, bloquant le récepteur TP, allait nous permettre de déterminer si le récepteur TP participait à l'inhibition de la formation des cellules  $\text{TRAP}^+$ .

Les résultats obtenus avec l'antagoniste du récepteur TP, soit le SQ 29548, témoignent de l'inefficacité de ce produit à augmenter le nombre de cellules  $\text{TRAP}^+$  par rapport au témoin (figure 29). En conclusion, le récepteur n'a eu aucune activité dans notre système dans les conditions du témoin.



**FIGURE 27** EFFET DU U46619 SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M) avec l'addition du U46619 (1  $\mu$ M), agoniste des récepteurs TP, sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu contenant l'indométacine et le U46619 le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 3, \*\* P< 0.01 par rapport à l'indométacine 100  $\mu$ M)

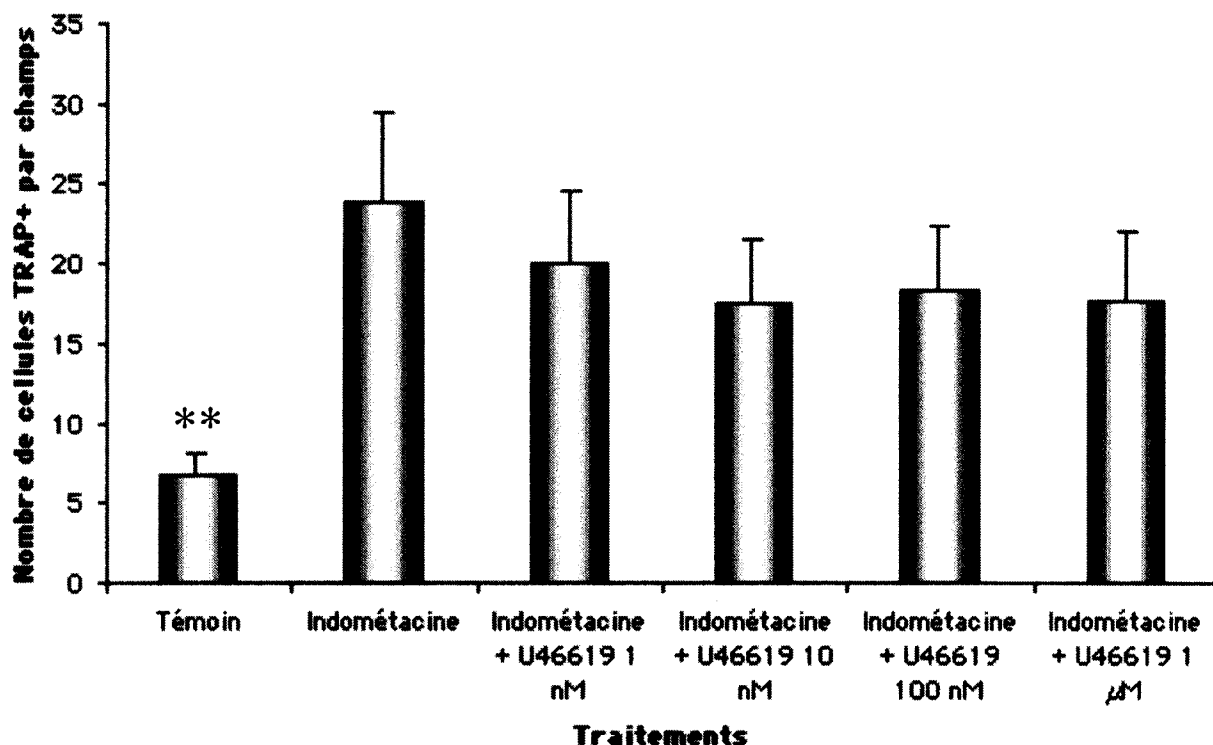
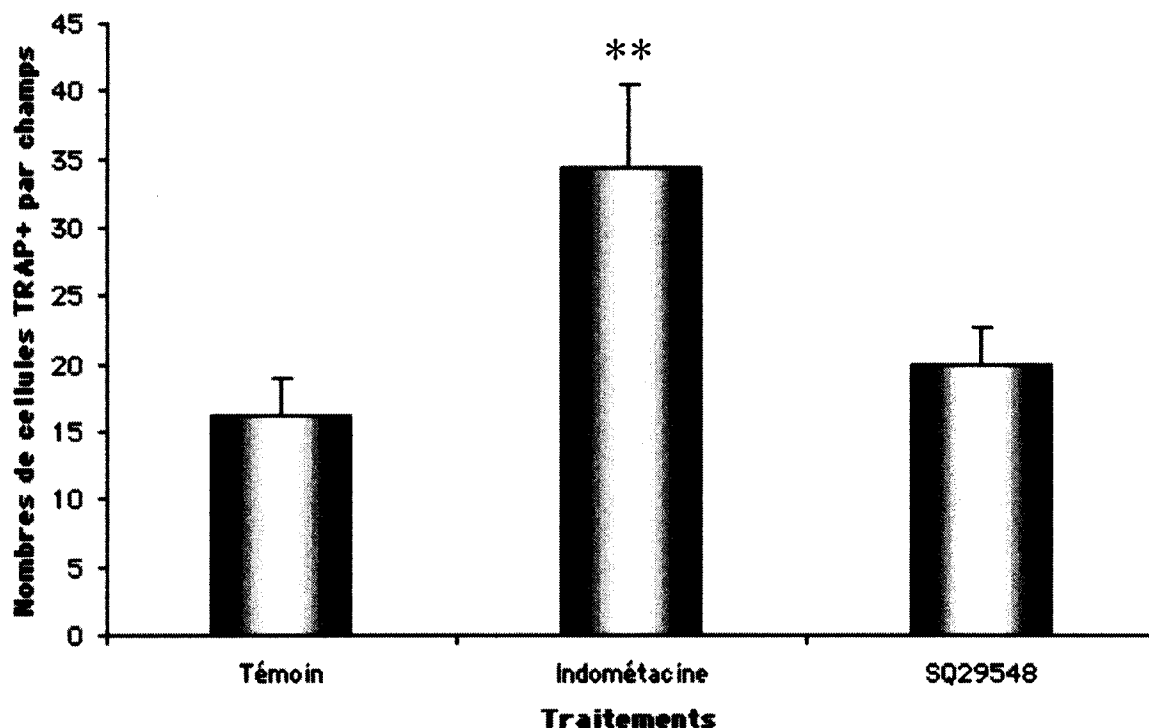


FIGURE 28 EFFET DU U46619 SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup> INDUITE PAR L'INDOMÉTACINE

Essais d'inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M) avec l'addition du U46619, agoniste des récepteurs TP, à différentes concentrations sur des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) en culture pendant 8 jours avec changement du milieu contenant l'indométacine et le U46619 le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \*\* P< 0.01 par rapport à l'indométacine 100  $\mu$ M)



**FIGURE29** EFFETS DE L'ANTAGONISTE DES RÉCEPTEURS TP SUR LA FORMATION DES CELLULES TRAP<sup>+</sup>

Inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 par l'indométacine (100  $\mu$ M). L'antagoniste SQ29548 (1  $\mu$ M) bloque les récepteurs TP1 et TP2. Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des composés à étudier pendant 8 jours avec un changement du milieu contenant les composés étudiés le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans 5 champs de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). (SEM, n = 5, \*\* P< 0.01 par rapport au témoin)

## 7. Implication de l'ostéoprotégérine dans l'ostéoclastogénèse observé

La régulation de l'ostéoclastogénèse se fait en partie par le système du RANKL, OPG et RANK. Puisque nous avons démontré que les AINS étaient capables d'augmenter le nombre de cellules qui expriment la phosphatase acide résistante aux tartrates par l'inhibition de la COX-2, nous avons alors décidé de vérifier si l'inhibition de la COX-2 dans notre système agissait sur cette même voie.

Nous avons déterminé si l'ARNm de l'ostéoprotégérine (OPG) était présente dans notre culture de cellules de foie fœtal dans les conditions où nous avons obtenu une augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> ainsi qu'en présence d'agents connus pour agir sur l'expression de l'ostéoprotégérine : le véhicule (éthanol), indométacine, indométacine + PGE<sub>2</sub>, 1, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> + dexaméthasone et finalement IL-1 (figure 30). Nous avons observé par RT-PCR de l'ARNm de l'OPG dans notre culture de cellules du foie humain fœtal mais sans variation de la bande témoin par rapport aux stimulations. Cependant, l'ARNm du GAPDH semble avoir une variation vers la baisse pour les stimulations indométacine + PGE<sub>2</sub>, 1, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> + dexaméthasone et IL-1 par rapport aux témoin et l'indométacine. Ce genre d'étude n'est pas quantitative. Donc, on ne pouvait pas conclure qu'il y avait une augmentation d'expression d'ostéoprotégérine. Cependant, elle est qualitative et nous avons bien démontré la présence d'ARNm de l'ostéoprotégérine dans notre culture.

Quoiqu'il y avait de l'ostéoprotégérine dans notre culture, nous devions déterminer si elle avait une action dans notre préparation. L'addition d'anticorps anti-OPG devrait empêcher la fonction de l'ostéoprotégérine. L'effet escompté serait alors une augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> dans notre système.

En effet, les anticorps polyclonaux anti-OPG ont été capables d'augmenter le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> dans le système à un niveau semblable à celui de l'indométacine (figure 31). Nous savions alors que l'ostéoprotégérine dans notre système est présente et impliquée dans l'inhibition de la formation de cellules TRAP<sup>+</sup>. De plus, nous avons observé qu'une stimulation avec le 11 deoxy PGE<sub>1</sub> (1  $\mu$ M) n'a pas produit une quantité suffisante d'OPG pour renverser l'effet des anticorps polyclonaux anti-OPG (figure 32). Nous avons alors déterminé la quantité d'OPG dans notre système avec différentes conditions de culture par ELISA. Nous avons observé que les cellules témoins libéraient beaucoup d'OPG dans le surnageant (figure 33).

On prévoyait obtenir une diminution dans la concentration d'OPG lors de l'inhibition de la COX-2 puisque nous avons observé une augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> lorsque la COX-2 était inhibée. Par contre, nous n'avons pas observé de diminution significative de la concentration d'OPG lors des incubations avec indométacine, ibuprofène, DFU, NS-398 et le valeryl salicylate par rapport au témoin (figure 33).

Cependant, nous avons observé une petite augmentation de la concentration d'OPG en présence de PGE<sub>2</sub> avec indométacine (figure 34). L'augmentation de la concentration d'OPG dans le surnageant induite par PGE<sub>2</sub> était probablement trop petite pour expliquer tous les résultats obtenus pour l'indométacine et l'indométacine + PGE<sub>2</sub> sur le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. Une nouvelle étude a été faite pour déterminer sur quels récepteurs EP la PGE<sub>2</sub> agissait pour induire l'augmentation d'OPG.

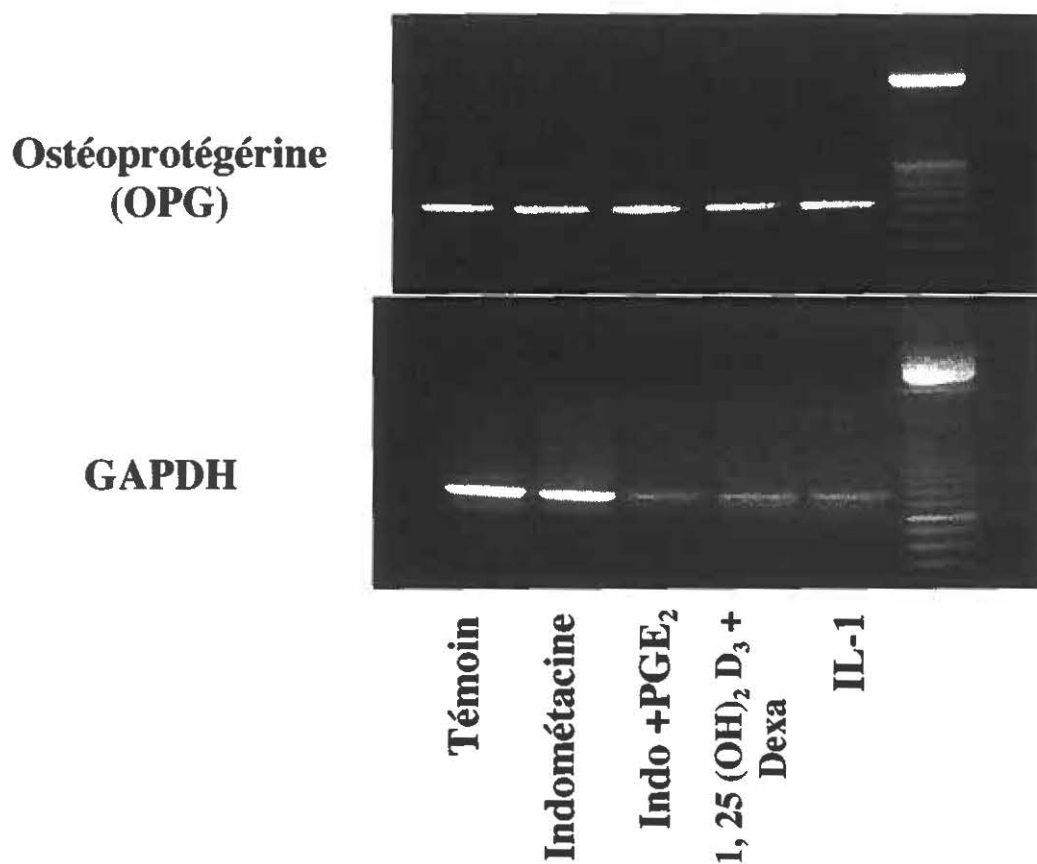
## 7.1 Récepteurs aux PGs et OPG

Maintenant que nous savions qu'un récepteur à la  $PGE_2$  était impliqué dans l'inhibition de la formation de cellules  $TRAP^+$ , nous devons identifier celui ou ceux qui étaient responsables de l'augmentation de l'OPG. Nous avons déjà démontré que la stimulation de EP2 et EP3 seuls ne pouvait pas renverser l'augmentation des cellules  $TRAP^+$  induites par l'indométacine puisque butaprost (agoniste EP2) et sulprostone (agoniste EP3) n'avaient pas eu d'effet. Toutefois, lors de notre étude avec le 17-phényl  $PGE_2$  (agoniste EP1) et le 11-déoxy  $PGE_1$  (agoniste EP2 et EP4), nous avons observé une diminution des cellules  $TRAP^+$  et nous suspicions l'implication de l'OPG. Alors, nous avons investigué la concentration d'OPG dans le surnageant de nos cultures en présence de ces agonistes. Nos résultats démontrent que la  $PGE_2$  était capable d'augmenter la concentration d'OPG. De plus, cet effet passait par le récepteur EP1 puisque le 17-phényl  $PGE_2$  a eu un effet semblable à la  $PGE_2$  et le 11 déoxy  $PGE_1$  n'a pas eu d'effet (figure 35).

Nous avons aussi étudié les effets des récepteurs DP, FP, IP et TP sur la concentration d'OPG dans nos cultures (figure 36). Le BW245C (agoniste DP) et le fluprosténol (agoniste FP) n'ont pas eu d'effet sur la concentration d'OPG. La carbaprostacycline (agoniste IP) a diminué la concentration de l'OPG significativement quoique ceci n'a pas induit une augmentation des cellules  $TRAP^+$  induites par l'indométacine. Le U46619 a causé une importante augmentation de la concentration d'OPG ce qui correspondait avec la diminution du nombre de cellules  $TRAP^+$  induites par le U46619. L'habileté du récepteur TP à induire une augmentation d'OPG



remarquable fait de sa voie de signalisation et de son récepteur une cible thérapeutique avec un grand potentiel pour le traitement de l'ostéoporose.



**FIGURE 30** RÉSULTATS DE L'ÉTUDE RT-PCR POUR L'OSTÉOPROTÉGÉRINE OBTENUS DES CULTURES DU FOIE HUMAIN FŒTAL

Culture des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) dans des pétris de 10 cm (100 000 cellules/ml, 10 ml par pétris) en culture avec les composés à étudier : Témoin (éthanol 1  $\mu$ l/ml), Indométacine (100  $\mu$ M), 1, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamine D<sub>3</sub> (10<sup>-7</sup>M), dexamétasone (10<sup>-6</sup>M), IL-1 (10 U/ml). La culture a été entretenue pendant 8 jours avec un changement du milieu de culture le quatrième jour. Le huitième jour, l'extraction de l'ARN total a été accomplie.

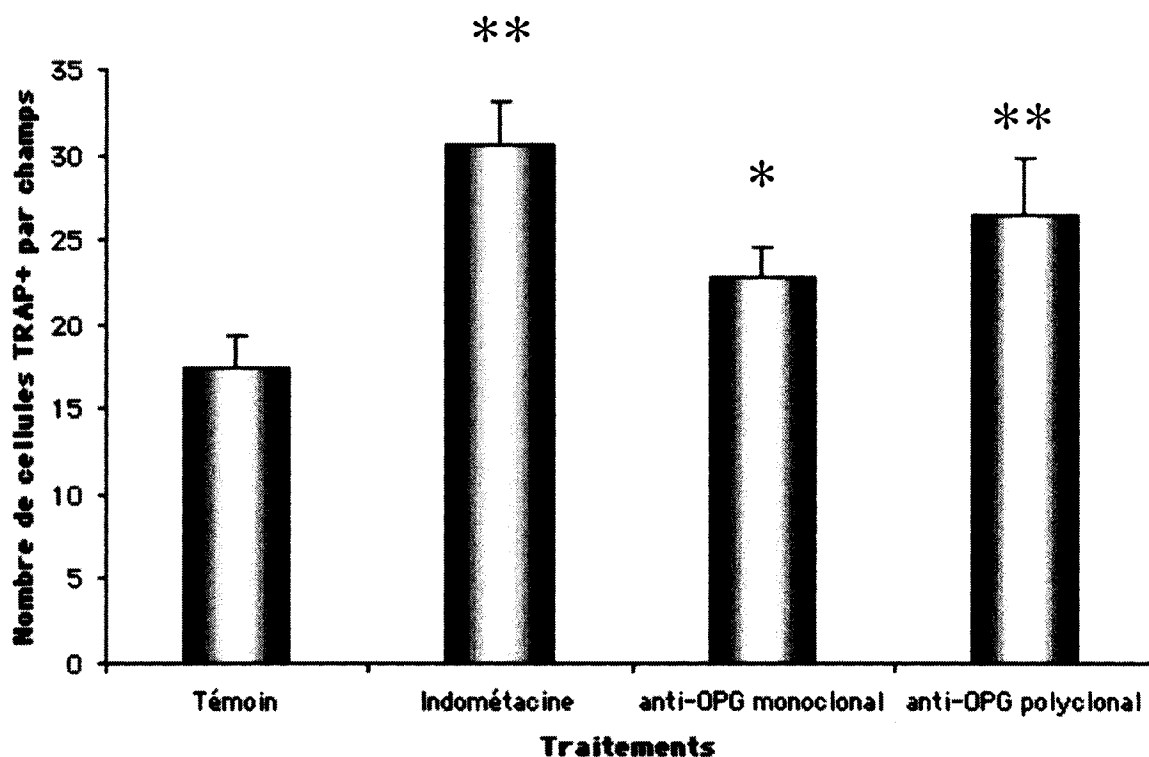


FIGURE31 IMPLICATION DE L'OPG DANS LE SYSTÈME DE DIFFÉRENTIATION OSTÉOCLASTIQUE DU FOIE HUMAIN FŒTAL

Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des traitements à étudier : indométacine (100  $\mu$ M), anticorps monoclonal anti-OPG (2.5  $\mu$ g/ml), anticorps polyclonal anti-OPG (2.5  $\mu$ g/ml), pendant 8 jours avec un changement du milieu contenant les mêmes composés le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans un champ de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). ( $\pm$  SEM, n = 3, \* P< 0.05, \*\* P< 0.01 par rapport au Témoin)

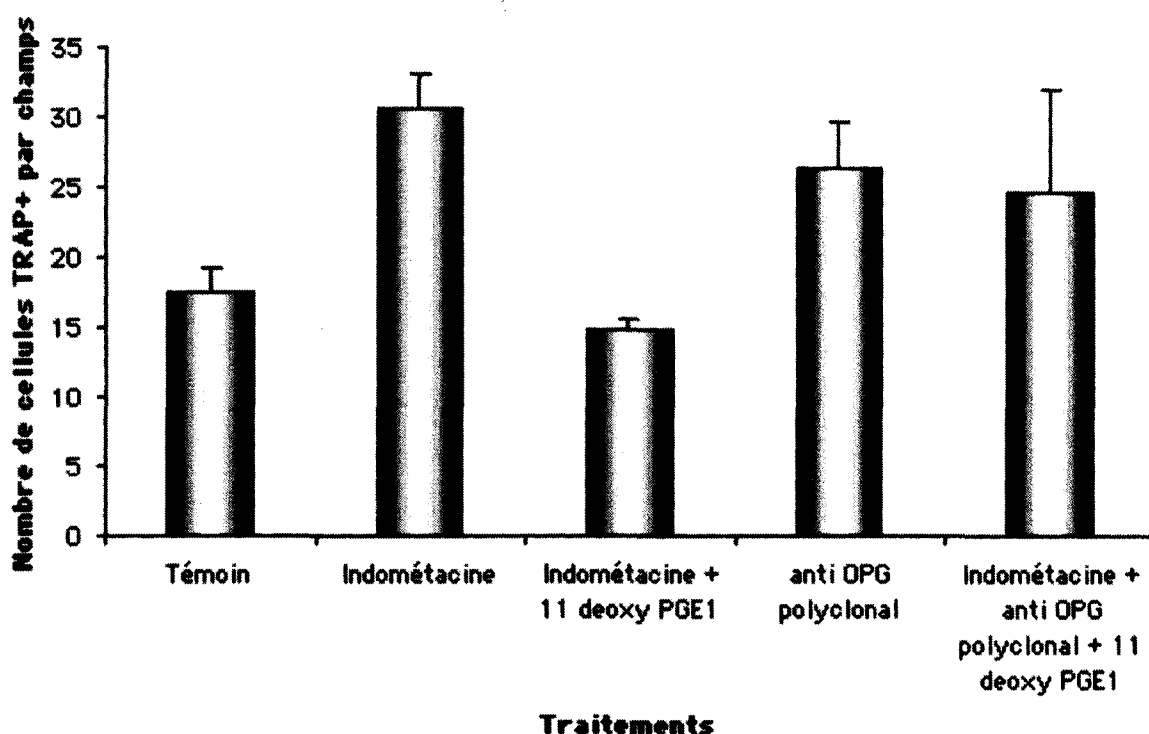
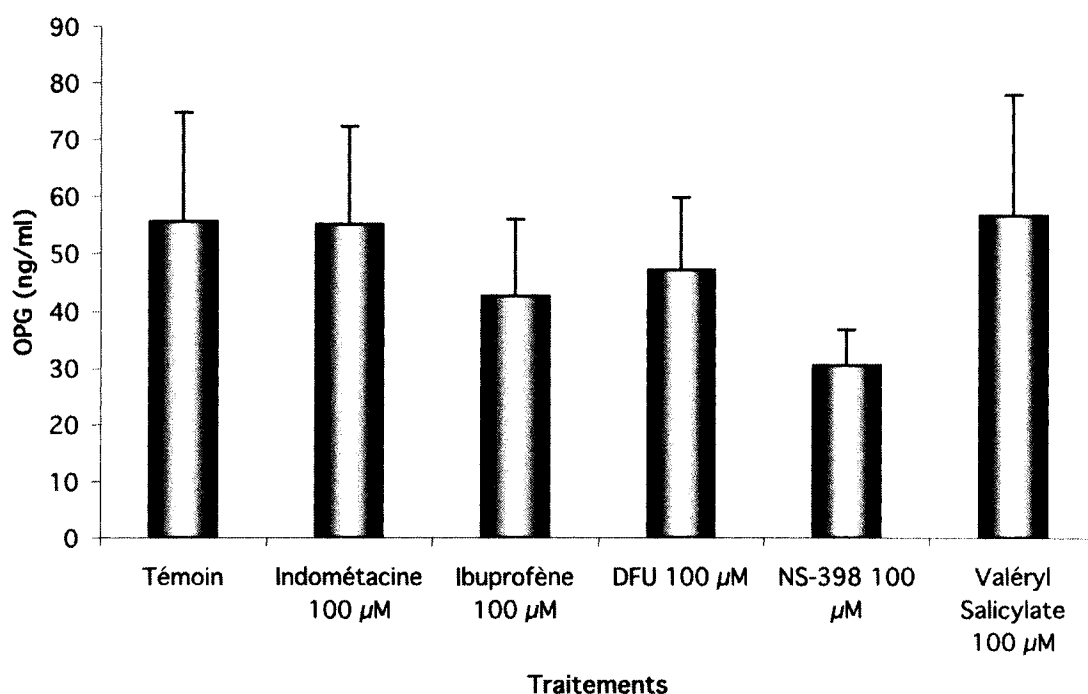


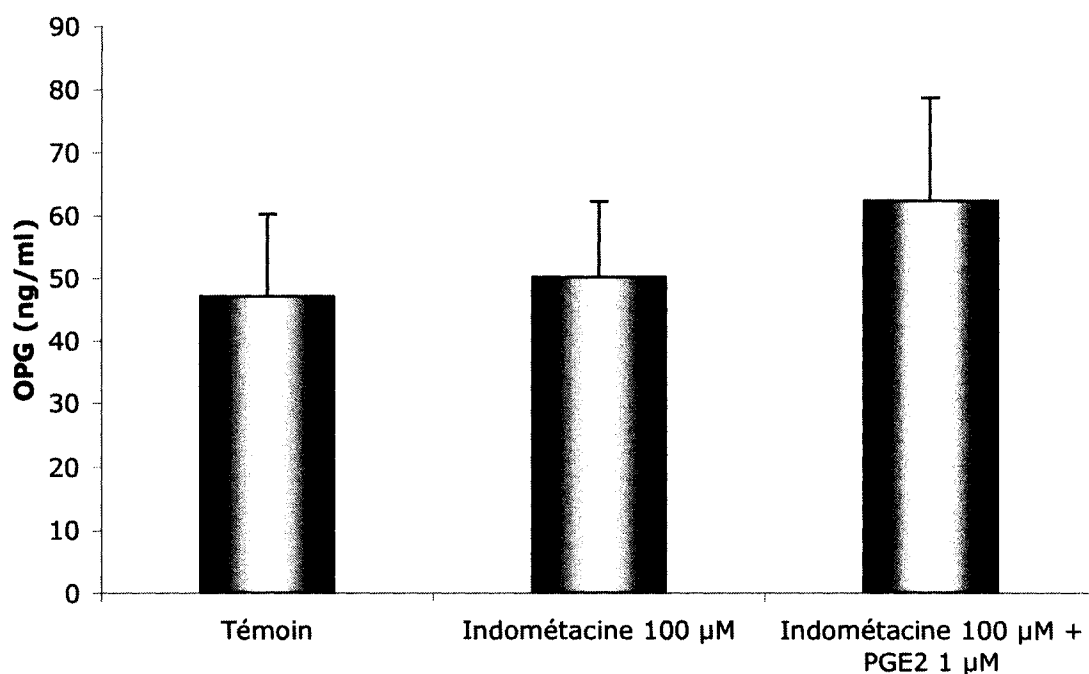
FIGURE 32 IMPLICATION DE L'OPG DANS LA RÉPONSE AU 11 DÉOXY PGE<sub>1</sub> DANS LE SYSTÈME DE DIFFÉRENTIATION OSTÉOCLASTIQUE DU FOIE FŒTAL HUMAIN

Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des traitements à étudier : indométacine (100  $\mu$ M), 11 déoxy PGE<sub>1</sub> (1  $\mu$ M), anticorps polyclonal anti-OPG (2.5  $\mu$ g par ml) pendant 8 jours avec un changement du milieu contenant les mêmes composés le quatrième jour. Le huitième jour, les cellules ont été fixées et une coloration enzymatique pour la phosphatase acide résistante aux tartrates (TRAP) a été accomplie. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> a été compté dans un champ de microscopie à un grossissement de 200x (aire de 0.7854 mm<sup>2</sup>). ( $\pm$  SEM, n = 3)



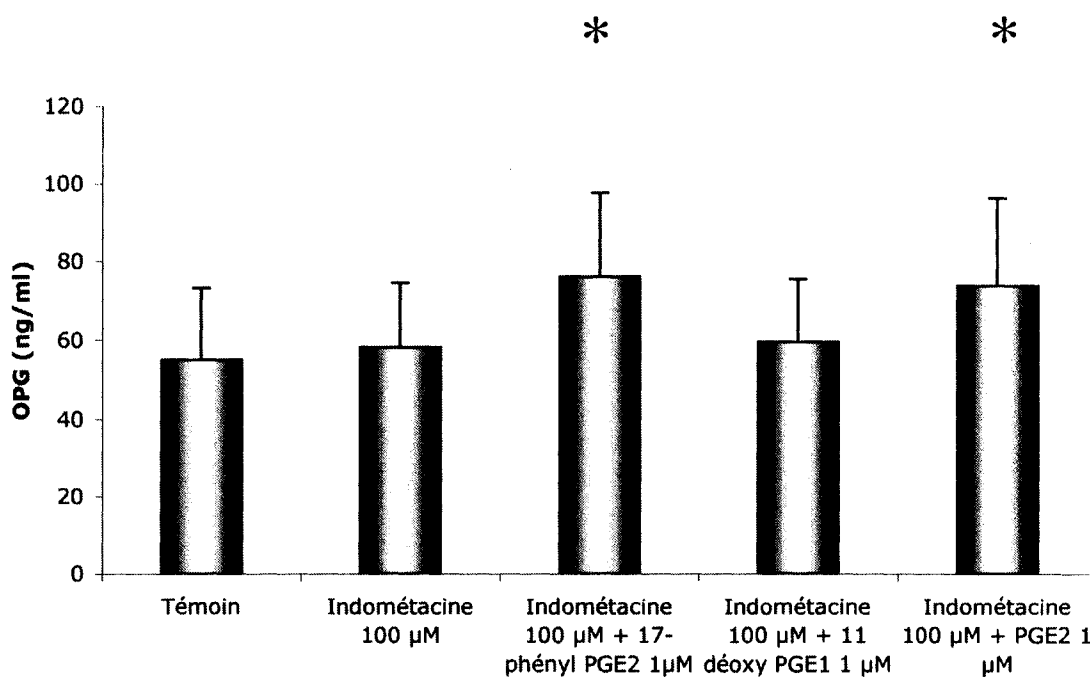
**FIGURE 33** EFFETS DES AINS SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CULTURES DE CELLULES DE FOIE HUMAIN FŒTAL

Tous les AINS ont été étudiés à la concentration de 100 µM. Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des traitements à étudier pendant 8 jours avec un changement du milieu le quatrième jour. Le huitième jour, le surnageant a été prélevé et un ELISA a été effectué pour l'OPG. (± SEM, n = 6)



**FIGURE 34** EFFET DE LA PGE<sub>2</sub> SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CELLULES DE FOIE FŒTAL

Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des traitements à étudier : indométacine (100 µM) et PGE<sub>2</sub> (1 µM), pendant 8 jours avec un changement du milieu le quatrième jour. Le huitième jour, le surnageant a été prélevé et un ELISA pour l'OPG a été effectué. (± SEM, n = 6)



**FIGURE 35 EFFETS DES AGONISTES EP1 ET EP4 SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CULTURES DE CELLULES DE FOIE HUMAIN FŒTAL**

Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des traitements à étudier : indométacine (100 µM) et les agonistes EP (1µM), pendant 8 jours avec un changement du milieu le quatrième jour. Le huitième jour, le surnageant a été prélevé et un ELISA pour l'OPG a été effectué. ( $\pm$  SEM, n = 7, \* P< 0.05 par rapport à indométacine 100 µM)

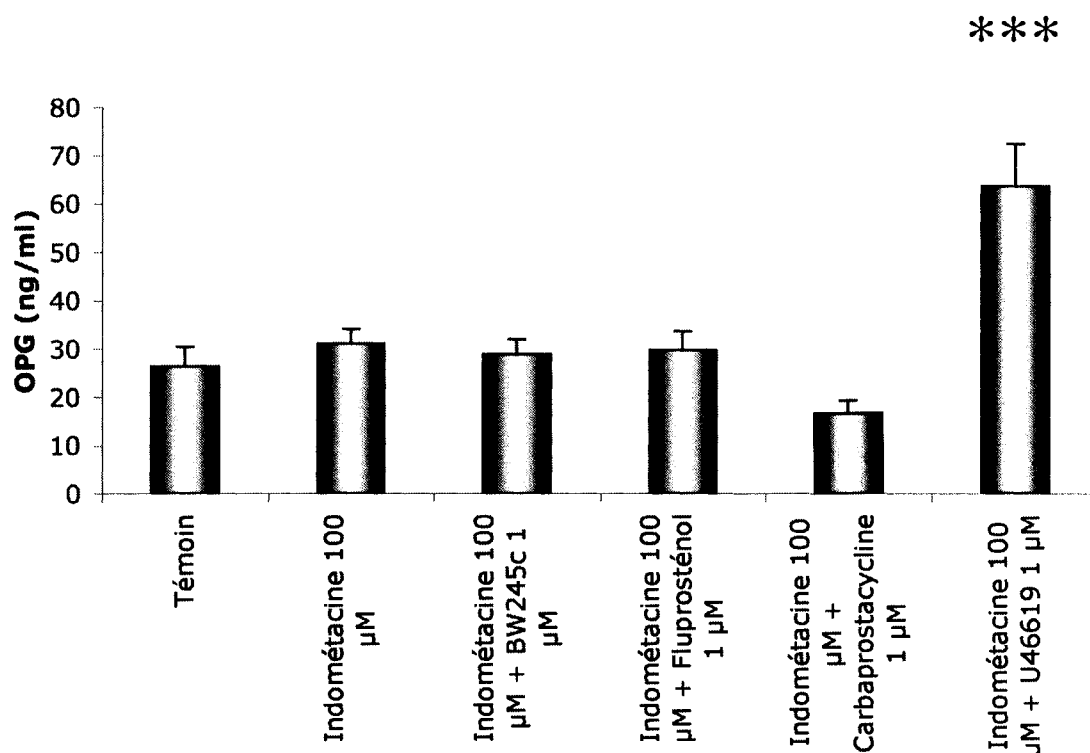


FIGURE 36 EFFETS DES AGONISTES POUR LES RÉCEPTEURS DP, FP, IP ET TP SUR LA CONCENTRATION D'OPG DANS LE SURNAGEANT DES CULTURES DE CELLULES DE FOIE HUMAIN FŒTAL

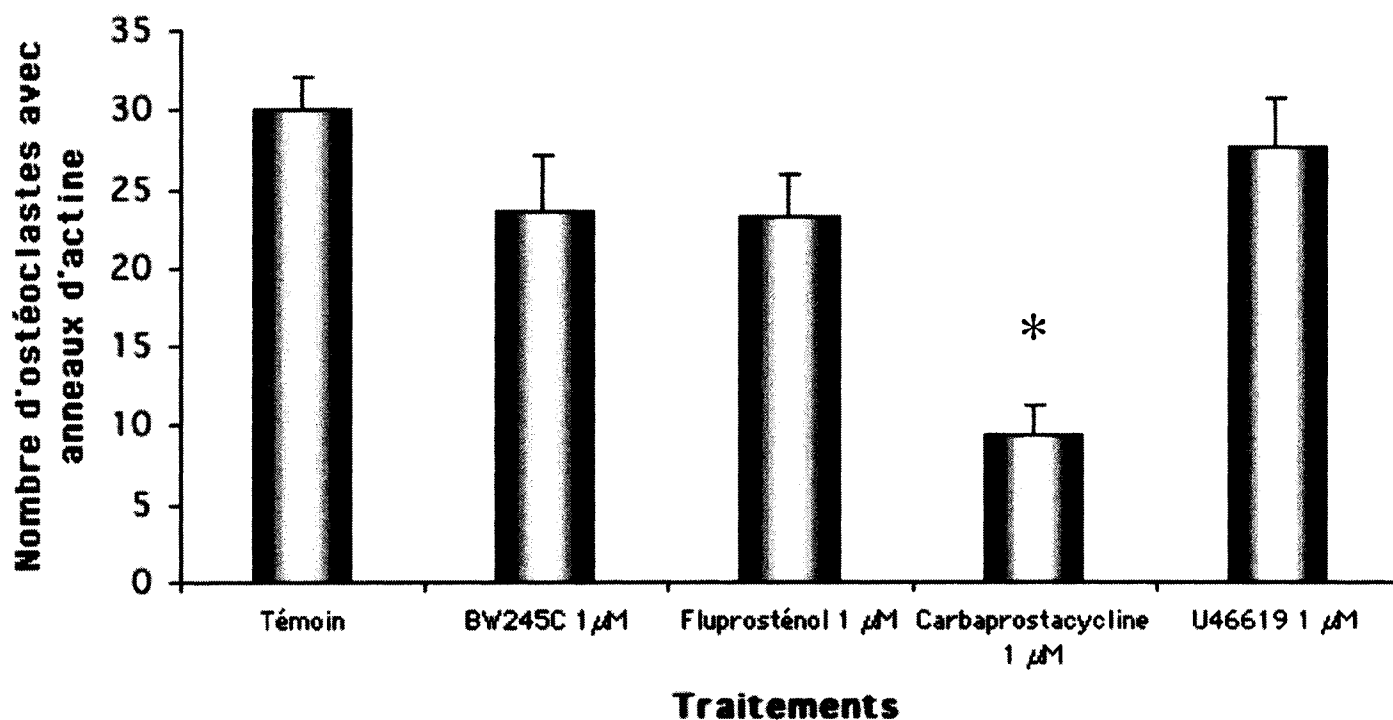
Des préparations de cellules de foie fœtal (15 à 20 semaines d'âge) ont été mises en culture avec les doses indiquées pour chacun des traitements étudiés indométacine (100  $\mu$ M) et les agonistes (1  $\mu$ M) pendant 8 jours avec un changement du milieu le quatrième jour. Le huitième jour, le surnageant a été prélevé et un ELISA pour l'OPG a été effectué. ( $\pm$  SEM, n = 6, \*\*\* P< 0.001 par rapport à indométacine 100  $\mu$ M)



## **8. Anneau d'actine des ostéoclastes humains matures et les prostaglandines**

Au cours de ses travaux de doctorat, Patrice Sarrazin a élaboré la méthode d'extraction d'ostéoclastes humains matures en se basant sur une méthode similaire décrite pour extraire des ostéoclastes de lapins et a développé un système pour étudier les récepteurs des prostaglandines sur les ostéoclastes humains en culture. Ses travaux ont démontré que le récepteur EP4 avait une action très rapide sur la destruction de l'anneau d'actine qui est nécessaire aux ostéoclastes pour la résorption osseuse.

J'ai poursuivi une étude semblable, mais avec les récepteurs DP, FP, IP et TP. La première série d'expériences a été faite pour déterminer si l'un de ces récepteurs avait une action sur les anneaux d'actine des ostéoclastes. Parmi tous les agonistes étudiés soit, le BW245C, le fluprostenol, la carbaprostacycline et le U46619, il n'y a que la carbaprostacycline qui a réussi à diminuer le nombre d'ostéoclastes possédant des anneaux d'actine par rapport aux témoins (figure 37).



**FIGURE 37 ACTIONS DES AGONISTES DES RÉCEPTEURS DP, FP, IP ET TP SUR LE NOMBRE D'OSTÉOCLASTES MATURES AVEC UN ANNEAU D'ACTINE**

Les ostéoclastes matures ont été mises en culture pour 20 heures sur des lamelles de verre. Une précubation avec l'indométacine (2  $\mu$ M) d'une heure pour permettre un retour à l'équilibre des structures d'actine a été accomplie. Les cellules ont été stimulées par les agonistes des récepteurs DP, FP, IP et TP pendant 5 minutes. La réaction a été arrêtée en aspirant le milieu et en ajoutant 1 ml de PBS contenant 3.7 % de formaldéhyde pendant 10 minutes et rincées 2 fois avec du PBS. Par la suite, une coloration des filaments de F-actine a été accomplie. ( $\pm$  SEM, n = 4)

## DISCUSSION

### 1. Système d'os dégénéré

Suite à nos expériences, nous avons conclu que le système d'os dégénéré n'est pas un système approprié pour l'étude des AINS, des cyclooxygénases et des prostaglandines dans le mécanisme de différenciation de l'ostéoclaste et ce, pour plusieurs raisons.

Premièrement, ce système nécessite la présence de corticoïdes tels que la dexamétasone ou l'hydrocortisol. Les corticoïdes sont des produits qui agissent sur plusieurs mécanismes dans les cellules. Particulièrement, la dexaméthasone inhibe l'expression de la cyclooxygénase-2 chez plusieurs types cellulaires.

Deuxièmement, les temps de culture ne permettent pas des protocoles à court terme. Ces derniers sont importants lorsque l'on travaille avec les prostaglandines et des cultures primaires à haut risque de contamination, surtout si on fait 3 changements de milieu par semaine pendant 3 semaines.

Troisièmement, le nombre de spécimens est un facteur limitant et très important surtout s'il y a plusieurs projets dépendants du même tissu primaire. De plus, un spécimen est suffisant seulement pour une expérience avec un petit nombre de conditions en duplicata.

Bref, le système d'os dégénéré n'était pas approprié pour les études que nous prévoyions accomplir. Par contre, le système pourrait être excellent pour l'étude de l'ostéoclastogénèse induite par les corticoïdes, la deuxième plus importante cause d'ostéoporose.

## **2. Modèles avec coculture**

Avant la découverte et la disponibilité du RANKL, plusieurs méthodes de culture des ostéoclastes étaient dépendantes de méthodes nécessitant des cocultures avec des types cellulaires qui produisaient le RANKL tels que les MC3T3, ST-2, UMR106 (ATKINS *et al.*, 2000, NEALE *et al.*, 2000, TAKAI *et al.*, 1998). Les premières méthodes de culture avec lesquelles nous avons travaillé étaient de ce type.

### **2.1 Moelle osseuse fœtale et ostéoblaste humain**

La méthode de la moelle osseuse fœtale en coculture avec les ostéoblastes humains a été développée avec le protocole de culture d'ostéoclastes à partir de la moelle osseuse de souris en culture avec les ostéoblastes de souris (JIMI *et al.*, 1996). Ce qui est particulier avec les méthodes utilisant les moelles osseuses de souris, c'est que cette moelle à elle seule peut produire des cellules semblables aux ostéoclastes.

Notre protocole avec la moelle osseuse de fœtus humain et les ostéoblastes humains en culture n'a pas apporté le succès espéré. Nous avons obtenu quelques cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées. Cependant, elles ont toujours été trop rares pour faire des analyses statistiques. De plus, il y a très peu de moelle osseuse chez le fœtus de 14 à 20 semaines.

### **2.2 Rate fœtale humaine et ostéoblastes SaOS-2**

La méthode de la rate humaine fœtale en coculture avec la lignée d'ostéoblastes humains SaOS-2 était basée sur des publications où on utilisait des rates de souris néonatales avec, soit des ostéoblastes de souris, soit des lignées de cellules stromales de souris telles que : ST2, MC3T3-G2/PA6, KS-4 (JIMI *et al.*, 1996; UDAGAWA *et al.*,

1989). Par contre, plusieurs des publications utilisaient de la dexaméthasone dans leurs protocoles (QUINN *et al.*, 2000; YASUDA *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 1998; MATSUZAKI *et al.*, 1998; KAJI *et al.*, 1997; TAKANASHI *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1992; UDAGAWA *et al.*, 1990), un produit que l'on ne peut pas utiliser si l'objectif est d'étudier les cyclooxygénases et les prostaglandines. La dexaméthasone stimule l'expression et la formation du RANKL à la surface des ostéoblastes humains et des cellules stromales. De plus, la dexaméthasone bloque l'expression de l'OPG et donc diminue la quantité d'ostéoprotégérine dans le surnageant des cultures d'ostéoblastes et des cellules stromales. Cette baisse d'expression de l'OPG permet alors à plus de récepteurs RANK d'être activés par le RANKL.

Nous avons réussi à produire des cellules TRAP<sup>+</sup> avec ce protocole. Toutefois, le nombre de cellules était insuffisant et la variation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> entre les témoins d'un même fœtus ne permettait pas de faire une interprétation des résultats. Nous avons conclu qu'il y avait trop d'agents à contrôler dans cet essai. Les précurseurs ostéoclastiques, les cellules stromales et les ostéoblastes peuvent tous répondre aux prostaglandines ou libérer d'autres facteurs qui peuvent agir sur l'ostéoclastogénèse.

### **2.3 Rate fœtale humaine et ostéoblastes SaOS-2 fixés**

Ce nouveau système d'ostéoclastogénèse était la réponse au grand nombre de facteurs pouvant agir ou intervenir sur le système précédant. Si on peut complètement contrôler un facteur dans le système, nous pouvons mieux comprendre l'action des autres facteurs.

Premièrement, une source de RANKL était essentielle. Alors, la culture des SaOS-2 avec de la dexaméthasone pour stimuler l'expression et la formation de RANKL

à la surface des SaOS-2 satisfaisait ce besoin (QUINN *et al.*, 2000). Par la suite, il était alors possible de faire une coculture avec les précurseurs ostéoclastiques sans la présence de dexaméthasone directement dans la culture.

Deuxièmement, il fallait éliminer la source d'OPG dans le surnageant qui aurait pu être produite par les SaOS-2 en coculture. La fixation des SaOS-2 par la paraformaldéhyde 1 % avait pour but d'empêcher la libération de l'OPG dans le surnageant et d'assurer la disponibilité du RANKL pour les préostéoclastes dans la culture.

Quoique nous ayons réussi à produire des cellules TRAP<sup>+</sup> avec ce nouveau protocole, le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> obtenues des rates était insuffisant. De plus, on obtenait plusieurs puits de culture avec un détachement des cellules de la plaque à 96 puits. Il est fort probable que la fixation des SaOS-2 avec la paraformaldéhyde et les nombreux rinçages avec le PBS favorisaient le détachement des cellules.

Finalement, la rate humaine fœtale ne satisfaisait pas nos besoins en tant que source de précurseurs ostéoclastiques pour les études. Nous avons alors commencé des études avec le foie de fœtus humain en coculture avec les SaOS-2 fixés. Les premières expériences possédaient des puits témoins sans SaOS-2, sans  $1, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  et sans dexaméthasone où nous avons observé de nombreuses cellules TRAP<sup>+</sup>. Le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par champ que l'on a obtenu était identique à celui avec les SaOS-2 fixés et on ne perdait aucun puit dû au détachement des cellules. De plus, un seul foie de fœtus humain de 15 à 20 semaines était capable de produire 4 plaques de 96 puits aisément. Nous avons donc choisi ce système sans coculture des cellules du foie humain de fœtus

pour les études des cyclooxygénases et des prostaglandines et leurs implications dans l'ostéoclastogénèse.

### **3. Modèle d'ostéoclastogénèse avec la culture des cellules du foie**

Nos premières études ont démontré que les cellules du foie fœtal humain contenant une faible population de cellules de la lignée monocytes/macrophages étaient capables de différencier ceux-ci et de produire des ostéoclastes multinucléés TRAP<sup>+</sup> dans nos préparations. La préparation des cellules du foie n'avait pas besoin de RANK ligand exogène pour différencier la population de cellules de la lignée monocytes/macrophages en cellules TRAP<sup>+</sup>. De plus, la vitamine 1, 25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> et le dexaméthasone n'étaient pas nécessaires pour obtenir des cellules TRAP<sup>+</sup>. Étant donné que les puits témoins produisaient des cellules TRAP<sup>+</sup>, il était possible d'identifier des produits capables de diminuer l'ostéoclastogénèse ainsi qu'identifier les composés qui activent l'ostéoclastogénèse. Le protocole que nous avons développé devait permettre l'observation d'une baisse ou d'une augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport aux témoins.

Étant donné que le foie n'est pas un tissu auquel on attribue beaucoup d'influence sur le métabolisme osseux, nous avons fait plusieurs analyses pour déterminer si l'on possédait bien des ostéoclastes dans la culture. Plusieurs publications ont démontré que les ostéoclastes possèdent des marqueurs spécifiques par analyse avec la transcriptase inverse suivie d'une réaction en chaîne avec la polymérase (TONG *et al.*, 1994, UDAGAWA *et al.*, 1990). Nous avons démontré l'expression de l'ARNm du MMP-9, du récepteur à la calcitonine, de l'intégrine  $\beta_3$  et de la cathepsine K qui sont tous des marqueurs de lignées ostéoclastiques avec les mêmes protocoles des travaux de TONG *et*

*al.*, 1994 et UDAGAWA *et al.*, 1990. Cependant, les analyses n'ont pas démontré une variation de leur expression selon les composés étudiés. Ceci n'est pas hors du commun puisque nos analyses étaient d'ordre qualitatif et non quantitatif, c'est à dire, la présence ou l'absence des ARNm plutôt qu'une variation du niveau d'expression des ARNm. Une étude quantitative aurait nécessité un meilleur équipement (real time PCR) ou plusieurs fragments d'ADN compétitifs avec des contrôles sur l'efficacité de la transcriptase inverse.

L'observation d'un seul de ces marqueurs n'est pas une preuve de la présence d'ostéoclastes. Par contre, la présence de tous ces marqueurs, en plus de l'activité de la phosphatase acide résistant aux tartrates, de la multinucléation et de la réponse aux sérums anti-OPG ensemble démontraient la présence de précurseurs ostéoclastiques dans la préparation. De plus, les travaux récents de Rana Samadfam ont démontré que les cellules provenant du foie fœtal humain en présence de M-CSF et de RANKL étaient capable de produire des puits de résorption sur une matrice d'hydroxyapatite.

### **3.1 Amélioration pour le système**

Notre système identifiait seulement les cellules qui ont entrepris la voie de différenciation des ostéoclastes étant donné l'observation des cellules TRAP<sup>+</sup>. Cependant, nous n'avons pas réussi à identifier le lieu précis sur cette voie où les cellules TRAP<sup>+</sup> se retrouvaient : ostéoclastes mononucléées, ostéoclastes matures ou ostéoclastes résorbants.

Avec un ratio des cellules TRAP<sup>+</sup> mononucléées par rapport aux cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées, on identifierait si les cellules sont dans la phase d'ostéoclastes mononucléées ou d'ostéoclastes matures. Ceci serait accompli en passant les cellules des



96 puits sur des lamelles de verre lors de la dernière journée de culture. Les cellules s'adhéreraient et un décompte des cellules TRAP<sup>+</sup> mononucléées par rapport aux cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées serait fait après fixation et coloration des noyaux avec le propidium d'iodure.

Avec le système de Patrice Sarrazin, pour quantifier les anneaux d'actine des cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées, on différencierait entre un ostéoclaste mature d'un ostéoclaste en voie de résorber. Un décompte des cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées par rapport aux cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées avec un anneau d'actine nous identifierait la distribution des cellules TRAP<sup>+</sup> multinucléées.

Avec un système pour quantifier la résorption osseuse, on déterminerait si les cellules sont dans la phase d'ostéoclastes matures ou dans la phase d'ostéoclastes résorbants. Un décompte des cellules TRAP<sup>+</sup> par rapport aux plages de résorption nous permettrait d'identifier le ratio. Toutefois, si les AINS ou les prostaglandines agissent sur la résorption, l'effet de la différenciation ainsi que de l'activation des ostéoclastes seraient le résultat obtenu. Pour remédier à ceci, il serait possible de différencier les cellules en premier lieu et ensuite de les déposer sur les matrices à résorber avec un passage.

Une fois que la distribution des différents ratios serait connue pour les cultures témoins, on étudierait l'effet des composés sur la distribution des ostéoclastes mononucléées, ostéoclastes matures et ostéoclastes résorbants.

#### **4. Ostéoclastogénèse et cyclooxygénases**

Avec les AINS, nous avons démontré que la cyclooxygénase 2 était responsable de la production des prostaglandines dont l'effet était d'inhiber l'ostéoclastogénèse dans notre système. L'effet ne semble pas se faire par l'expression et la libération de l'OPG

dans le milieu de culture puisque les AINS n'ont pas changé ceux-ci. Néanmoins, une augmentation d'OPG a été observée lors de la stimulation des récepteurs EP1 et TP, ce qui empêche l'attachement du récepteur RANK à son ligand. Il est aussi possible que les prostaglandines aient eu un effet sur l'expression du RANKL comme il a été démontré par KANEMATSU *et al.* (2000). Toutefois, ceci n'a pas encore été examiné en profondeur dans notre système. Il y a maintenant une nouvelle littérature sur des effets biologiques des AINS COX indépendant. Il est peu probable que les effets observés sont COX indépendant puisque l'addition de la PGE<sub>2</sub>, un produit des COX, renverse l'effet observé des AINS. De plus, les différents AINS ont eu le même résultat soit l'augmentation du nombre des cellules TRAP<sup>+</sup>, ce qui rend négligeable la possibilité des effets COX indépendant qui sont connus comme étant très spécifique aux composés individuels et pas à tous les AINS.

Les AINS sont parmi les drogues les plus prescrites. Plusieurs effets secondaires importants et indésirables leur sont attribués. Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 tels que le Vioxx (Rofecoxib, Merck) et le Celebrex (Celecoxib, Pharmacia et Pfizer) ont été développés puisque la plupart des effets secondaires des AINS sont attribuables à l'inhibition de la COX-1. L'aspirine, un inhibiteur non sélectif de COX-1 et de COX-2 possède une toxicité gastrique (VANE et BOTTING, 1998). Le développement d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 a permis une réduction d'incidence des complications gastro-intestinales comparativement aux AINS traditionnels (VANE et BOTTING, 1998). Un des effets secondaires non désirables possible de l'inhibition spécifique de la COX-2 est une augmentation du risque d'événements thrombotiques cardiovasculaires. L'utilisation grandissante de ces nouvelles drogues a augmenté les études de leurs rôles

dans plusieurs systèmes. Les AINS non sélectifs diminuent à la fois la formation de prostacycline et de thromboxane. Par contre, les inhibiteurs sélectifs COX-2 diminuent la formation de prostacycline et déséquilibrent le ratio prostacycline/thromboxane pour thromboxane, un éicosanoïde prothrombotique. L'augmentation relative des thromboxanes, couplée à une diminution des prostacyclines, peut induire le développement d'événements cardiovasculaires thrombotiques. Même une suppression partielle des prostacyclines par des inhibiteurs de COX-2 est indésirable lors d'un syndrome aigu vasculaire occlusif. Cependant, ce même effet des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 pourrait être ostéoprotecteur puisque nous avons démontré que l'activation d'IP par la carbaprostacycline diminue la production d'OPG et que l'activation de TP par U46619 augmente la production d'OPG. Alors, chez les individus avec peu de risques de syndromes vasculaires occlusifs, mais à risque pour l'ostéoporose, les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 pourraient être ostéoprotecteurs et retarder ou même empêcher le début de l'ostéoporose par cette voie. Néanmoins, que devons-nous interpréter des résultats avec l'indométacine, l'ibuprofène, le NS-398 et le DFU puisqu'il est très clair que l'inhibition de la COX-2 dans notre système a stimulé la formation d'ostéoclastes. Ceci est très différent de ce qu'on retrouve dans les publications à ce jour. La plupart des publications démontrent qu'il est essentiel d'avoir de la COX-2 active pour obtenir des ostéoclastes lors de stimulation avec la PTH et l'IL-1 (OKADA *et al.*, 2003, OKADA *et al.*, 2000, KOIDE *et al.*, 1999, TOKUSHIMA *et al.*, 1997)

Toutefois, les deux résultats ne sont pas mutuellement exclusifs puisque toutes les autres études démontrent que la COX-2 est nécessaire à l'augmentation du nombre d'ostéoclastes induite par ces différentes stimulations, mais aucune n'a étudié la COX-2

seule et son effet sur la formation de cellules TRAP<sup>+</sup>. Donc, il est probable que l'inhibition de la COX-2 seule agisse par une voie différente que celle de l'inhibition de la COX-2 lors d'une stimulation inflammatoire ou autres. De plus, plusieurs autres systèmes d'ostéoclastogénèse utilisent des glucocorticoïdes dans leurs préparations cellulaires (TAKUMA *et al.*, 2003, HIRAYAMA *et al.*, 2002, WADA *et al.*, 2001, KAJI *et al.*, 1997, WADA *et al.*, 1994), des glucocorticoïdes que nous avons déjà prouvé être capables d'inhiber l'expression de la COX-2 (DE BRUM-FERNANDES *et al.*, 1994).

Finalement, la disruption du gène de la COX-2 chez la souris ne produit aucune anomalie histologique de l'os à 5 semaines. Cependant, la formation d'ostéoclastes stimulées par la vitamine 1, 25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> et la PTH était réduite de 60 % à 70 % chez les souris COX-2 <sup>-/-</sup> par rapport aux souris normales COX-2 <sup>+/+</sup>. La disruption du gène de la COX-1 chez la souris n'a pas eu d'effet sur les paramètres de l'étude par rapport aux souris normales (OKADA *et al.*, 2000).

## **5. Ostéoclastogénèse et récepteurs aux prostaglandines**

Il était important d'inhiber la production des prostaglandines pour plusieurs jours sans le renouvellement des milieux de culture, puisque une substance importante à la l'activation ou l'inhibition de l'ostéoclastogénèse pourrait être libérée dans le surnageant, alors nous avons utilisé l'indométacine à 100  $\mu$ M, environ 4x l'IC<sub>50</sub> de la COX-2 et 50x l'IC<sub>50</sub> de la COX-1. De plus, l'effet sur le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> était maximal à cette concentration d'indométacine ce qui nous permet de mieux évaluer les effets des prostaglandines dans cette série d'expérience.

La prostaglandine E<sub>2</sub> est la plus efficace à diminuer l'augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> lors de l'inhibition des COX par l'indométacine. Les récepteurs

impliqués sont EP4 et EP1. Il n'existe pas d'agoniste spécifique pour EP4. Par contre, le 11 déoxy PGE<sub>1</sub>, un agoniste de EP4 et de EP2, a inhibé l'ostéoclastogénèse dans notre étude. Le butaprost, un agoniste sélectif de EP2, n'a pas eu d'effet sur l'ostéoclastogénèse. De plus, le AH23848B, l'antagoniste sélectif du récepteur EP4, a augmenté l'ostéoclastogénèse en empêchant la PGE<sub>2</sub> endogène d'agir sur le récepteur EP4. Alors, on peut conclure que EP4 est très important à l'inhibition de l'ostéoclastogénèse et que la stimulation de EP2 seule est insuffisante pour l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. En revanche, on ne peut pas exclure qu'une stimulation double de EP2 et de EP4 soit nécessaire à cette inhibition d'ostéoclastogénèse. Le résultat avec le SC19220, l'antagoniste de EP1, démontre que la stimulation de celui-ci soit l'activation de la phospholipase C n'est pas nécessaire à l'inhibition de l'ostéoclastogénèse que l'on observe avec le témoin. Le résultat avec le AH6809, l'antagoniste de EP1 et de EP2, montre une légère augmentation d'ostéoclastogénèse. Toutefois, elle est non significative, l'activité endogène de EP2 est insuffisante pour inhiber l'ostéoclastogénèse.

Les récepteurs EP1 et TP ont causé de légères diminutions de l'ostéoclastogénèse induite par l'indométacine lors de leur activation. Ceci est intéressant puisqu'ils ont le même signal de transduction, soit l'activation de la phospholipase C et l'élévation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire libre. Néanmoins, aucun de ces récepteurs EP1 et TP est aussi puissant que EP4 dont le signal de transduction est une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase ce qui résulte en une élévation de l'AMPc intracellulaire.

La PGE<sub>2</sub> est bien connue pour ses effets sur la résorption osseuse et pour sa participation à la résorption osseuse induite par l'IL-1 et les lipopolysaccharides (LPS). Il y a trois articles qui ont utilisé la disruption génique chez les souris pour analyser ce

phénomène. Deux équipes ont démontré que la culture de cellules provenant de souris à disruption génique de EP4 engendre une déficience de la formation d'ostéoclaste induite par les lipopolysaccharides et les cytokines (SAKUMA *et al.*, 2000; MIYAURA *et al.*, 2000; SAKUMA *et al.*, 2000). Il est à noter qu'il n'y a pas seulement l'ostéoclastogénèse dépendante de PGE<sub>2</sub>, mais aussi l'ostéoclastogénèse dépendante de IL-1 qui est affectée par la mutation du gène EP4. Cependant, les réponses ostéoclastogéniques à la PGE<sub>2</sub>, l'hormone parathyroïdienne et le 1, 25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> *in vitro* sont significativement réduites dans les cultures de cellules provenant de souris avec une disruption génique de EP2 (LI *et al.*, 2000). La similitude apparente démontre bien le rôle de redondance des deux sous-types de récepteurs EP. De plus, un groupe a démontré une diminution de l'ostéoclastogénèse lorsqu'un antagoniste sélectif de EP4 est ajouté à la culture de cellules provenant des souris EP2 déficientes (LI *et al.*, 2000). Nos résultats pour les récepteurs EP4 et EP2 sont différents de ces derniers. L'addition de l'antagoniste EP4 a augmenté le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> dans nos essais et l'addition de l'agoniste EP4 a diminué le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. Ceci est probablement dû au fait que notre modèle n'utilisait pas des stimulations inflammatoires (IL-1, TNF $\alpha$ ) ou autres (PTH, M-CSF, GM-CSF) pour analyser l'implication de EP4 et de EP2 dans l'ostéoclastogénèse.

En plus de l'induction de la résorption osseuse, la PGE<sub>2</sub> exogène peut aussi induire la formation osseuse, quoique le récepteur responsable de cette réponse n'ait pas encore été identifié. Toutefois, il reste toujours à savoir dans quel contexte physiologique métabolique et/ou anabolique les actions de la PGE<sub>2</sub> sur l'os sont importantes. La contribution du récepteur EP4 à la résorption osseuse dans plusieurs conditions physiologiques et pathophysiologiques sur des souris intactes n'a pas encore été

examinée avec succès. Cela est dû à la non-disponibilité d'un nombre adéquat de souris adultes avec la disruption génique du EP4 à cause de leur mort prématurée due à des complications avec le ductus artériosus (SEGI *et al.*, 1998). La grande difficulté consiste à séparer l'effet des PGs sur les précurseurs ostéoclastiques et les cellules stromales qui les supportent. Un groupe de chercheurs a démontré que la PGE<sub>2</sub> inhibait directement l'activité de résorption osseuse chez les ostéoclastes matures de lapin et que cette inhibition empruntait le récepteur EP4 (Mano *et al.*, 2000). Ce que l'on a observé dans notre système est peut-être semblable. Étant donné que la stimulation du récepteur EP4 n'a pas eu d'effet sur la concentration d'ostéoprotégérine produite par les cellules stromales mais est capable de diminuer la formation de cellules TRAP<sup>+</sup>. Il est possible que l'activation du récepteur EP4 se fasse directement chez l'ostéoclaste et pas chez les cellules stromales.

## 6. Ostéoprotégérine

La régulation de l'ostéoclastogénèse se fait en partie par le système du RANKL, OPG et RANK. Nous avons donc étudié l'implication de l'ostéoprotégérine dans notre système. L'addition d'anticorps anti-OPG dans notre préparation a augmenté le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> et démontre l'implication de l'OPG dans nos préparations contrôles. L'OPG est exprimée en très grande quantité dans notre système alors la diminution de la concentration effective d'OPG faciliterait la liaison entre RANK et RANKL. Toutefois, les cellules précurseuses doivent déjà exprimer le récepteur RANK. Cela explique l'augmentation observée. La concentration d'OPG est inchangée après un traitement avec indométacine, ibuprofène, NS-398, DFU et le valéryl salicylate. L'augmentation du nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> induites par l'inhibition de la COX-2 ne se fait pas par

l'intermédiaire de l'OPG. Les prostaglandines agissant sur les récepteurs EPI et TP ont produit des augmentations de la concentration d'OPG. Ceci est intéressant puisqu'ils ont le même signal de transduction, soit l'activation de la phospholipase C causant l'élévation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire libre. La stimulation des récepteurs TP a produit une augmentation supérieure à la stimulation du récepteur EPI. Cette augmentation de la concentration d'OPG très élevée lors de la stimulation des récepteurs TP pourrait en faire une très bonne cible pharmacologique. Cependant, un agoniste TP seul n'est pas envisageable à cause des risques de thrombose. De plus, nous ne pouvons pas déterminer si l'augmentation observée serait significative *in vivo* étant donné les variations des niveaux d'OPG dans le sérum selon les publications 150 à 180 pg/ml (LIPTON *et al.*, 2002), 35 pg/ml (MISRA *et al.*, 2003) et 2300 pg/ml (ZIOLKOWSKA *et al.*, 2002). Toutefois, le foie peut être une source d'OPG pour réguler l'ostéoporose, il suffirait de trouver une drogue pour stimuler les cellules du foie à libérer l'OPG.

### 6.1 Ostéoprotégérine effet local et/ou systémique

L'ostéoprotégérine est un récepteur soluble du RANKL. Puisque l'OPG est un récepteur soluble, il ne peut avoir accès aux molécules intracellulaires. Donc, l'interaction entre RANKL et OPG ne peut pas stimuler une voie de signalisation et une réponse cellulaire (YAMAGUCHI *et al.*, 1998). L'OPG en compétitionnant avec RANK pour le RANKL inhibe l'action du RANK, de l'ostéoclastogénèse et la perte d'os subséquente. L'OPG est exprimé par plusieurs tissus et lignées cellulaires incluant les ostéoblastes, les cellules endothéliales et le foie (YAMAGUCHI *et al.*, 1998). La concentration d'OPG circulante chez la souris augmente lors de la gestation. Cela indique que la concentration d'OPG circulante joue un rôle important de protection



contre la perte osseuse excessive lors de la gestation chez les mammifères (YANO *et al.*, 2001). Les souris dont le gène de l'OPG a été rompu manifestent une ostéoporose sévère avec une augmentation remarquée d'ostéoclastes. Ces souris ne possèdent pas d'os trabéculaire. Toutefois, la surexpression de l'OPG chez la souris qui résulte en une ostéopétrose non létale coïncide avec une diminution des étapes tardives de la différenciation ostéoclastique semblable à celle d'une déficience en RANK ou RANKL (MIN *et al.*, 2000). Des effets semblables sont observés lors de l'administration d'OPG recombinante chez la souris (SIMONET *et al.*, 1997). L'OPG est bien tolérée chez les humains et peut être efficace dans le traitement des maladies osseuses caractérisées par une résorption osseuse telle que l'ostéoporose (BEKKER *et al.*, 2001). Une seule administration d'ostéoprotégérine est capable de diminuer les marqueurs de résorptions osseuses pendant plusieurs jours et même des semaines chez la souris (CROUCHER *et al.*, 2001; AKATSU *et al.*, 1998). Puisqu'une seule dose systémique est capable de contrôler la résorption osseuse, on peut conclure que l'ostéoprotégérine systémique est aussi importante que l'ostéoprotégérine locale produite par les ostéoblastes. Alors, des composés capables de stimuler l'OPG dans des organes autres que l'os pourraient avoir des bénéfices sur l'os. Nous avons démontré que le U46619 est capable d'augmenter l'OPG dans notre culture de cellules de foie. Alors, si on est capable de stimuler le foie à produire de l'OPG, cette production d'OPG pourrait être aussi efficace que l'OPG produit dans l'os pour inhiber l'ostéoclastogénèse.

## **6.2 Inhibition des COX et expression du RANKL**

Comment identifier si les PGs et les AINS agissent par la voie du RANKL/RANK.

Nous avons démontré que les prostaglandines diminuent le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup> et que, dans le cas de l'activation du EP4, cette diminution n'agit pas sur l'OPG. Il est possible que l'activation du récepteur EP4 diminue l'expression du RANKL ou de RANK. L'addition exogène du RANKL nous permettrait de déterminer l'importance du RANKL dans la diminution des cellules TRAP<sup>+</sup> induites par EP4 lors de traitements témoins, Indométacine, Indométacine + 11 deoxy PGE<sub>1</sub>. Puisque la préparation des cellules du foie possèdent plusieurs précurseurs hématopoïétiques, il est possible que l'activation du récepteur EP4 stimulerait les précurseurs des ostéoclastes vers d'autres voies de différenciation comme celle des granulocytes qui proviennent des mêmes cellules souches que les monocytes/macrophages. La diminution des précurseurs ostéoclastiques est possible puisqu'il a déjà été démontré que la PGE<sub>2</sub> régule la production de M-CSF des cellules stromales osseuses humaines. Alors, la diminution de M-CSF dans le système pourrait aussi expliquer les résultats obtenus dans nos expériences. Ainsi, la présence de moins de précurseurs ostéoclastiques engendrerait moins de cellules TRAP<sup>+</sup>.

## **7. Anneau d'actine**

Nous pouvons déterminer si un ostéoclaste est dans une phase résorbante ou non résorbante si celle-ci possède un anneau d'actine. La stimulation du récepteur IP par la carbaprostacycline a diminué le nombre d'ostéoclastes avec un anneau d'actine après 5 minutes. Ceci est un résultat important puisque les ostéoclastes sans anneau d'actine ne peuvent résorber l'os. Toutefois, nous ignorons la durée de cet événement. Une étude de la durée d'absence des anneaux d'actine en fonction du temps pourrait démontrer que cet événement est très important dans la régulation du métabolisme osseux. Si l'absence des

anneaux d'actine est prolongée cet effet pourrait être une cible pharmacologique pour la régulation de la résorption osseuse.

## **8. Éthique de l'utilisation des tissus fœtaux pour la recherche**

Lors de notre premier prélèvement de tissus fœtaux, on nous a conseillé de divulguer avec précaution que nous travaillions avec des tissus fœtaux provenant d'avortements. Le débat de l'utilisation des tissus fœtaux et des cellules souches provenant des zygotes congelés ou fraîchement préparés est très important pour la communauté de la santé et la communauté scientifique. Cela s'explique par le fait que nous avons commencé à découvrir le potentiel que possède cette voie de recherche pour de nouvelles thérapies. Tout récemment, le gouvernement américain a pris la décision de ne pas financer la recherche qui utilise les cellules souches provenant des zygotes fraîchement préparés ou congelés. Seule la recherche avec des lignées de cellules souches immortalisées aurait droit à des fonds de recherche du gouvernement fédéral des États-Unis. Au Canada, le gouvernement fédéral permet l'utilisation des cellules souches provenant des zygotes non utilisés par les cliniques de fécondité. Toutefois, il ne finance pas la recherche qui prépare les zygotes humains spécifiquement pour des études scientifiques. Ce sujet est assez important pour y consacrer quelques paragraphes.

L'avortement légal ou l'utilisation des zygotes congelés nous permet, avec le consentement du donneur, d'utiliser les tissus et les cellules prélevées pour nos recherches au même titre que les autres tissus prélevés au cours d'une intervention avec le consentement du patient. Cependant, les zygotes congelés et les fœtus ont le potentiel de devenir humain, alors qu'un tissu osseux tel que la tête fémorale d'un patient ayant subi une intervention chirurgicale ne le pourrait pas. C'est ce potentiel de devenir humain

qui est le cœur du conflit. Avec l'avancement des technologies et des techniques, le temps qui sépare un nouveau-né viable et la date limite pour un avortement se rapprochent rapidement.

L'histoire et la philosophie nous ont enseigné que la fin ne justifie pas toujours les moyens. Cependant, les nouvelles technologies et techniques ont déjà permis l'isolation de cellules souches dans différents organes et tissus adultes. Ces méthodes permettent des progrès semblables à ce que l'on peut prévoir pour les zygotes. Toutefois, la possibilité existe que des situations où les zygotes seront préférables aux cellules souches provenant de tissus adultes.

En conclusion, l'utilisation des tissus fœtaux ou des zygotes est en réalité une discussion philosophique plutôt que scientifique. Le fait est que la communauté scientifique continuera à progresser malgré les embûches dressées par les gouvernements. L'éducation de ces derniers aussi progressera et lorsque les retombées économiques seront démontrées, les gouvernements seront plus que satisfaits de financer ces projets de recherche sur les cellules souches. Il est de notre devoir d'encourager la discussion sur l'utilisation des zygotes humains et des tissus fœtaux pour que ceux qui profiteront des nouvelles thérapies puissent prendre une décision éclairée.

## CONCLUSION

Il existe deux sites d'action pour empêcher la résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes. Dans un premier temps, il y a l'ostéoclastogénèse, responsable de la formation des ostéoclastes qui migreront à la surface de la matrice osseuse pour commencer la résorption osseuse. Dans un deuxième temps, il y a l'activité de l'ostéoclaste mature lorsqu'il s'adhère à la matrice osseuse et commence la résorption osseuse.

Notre système d'ostéoclastogénèse humain est unique sur plusieurs points. Il ne nécessite pas de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , de dexaméthasone, de RANKL ou de M-CSF exogène. Il y a production spontanée de cellules avec plusieurs marqueurs des ostéoclastes : la phosphatase acide résistante au tartrate, le récepteur à la calcitonine, le récepteur RANK, la cathepsin K, le MMP-9 et le  $\beta_3$  intégrine. De plus, ce système répond à une baisse de l'OPG. Avec la production spontanée des cellules TRAP<sup>+</sup> dans notre système, on peut faire des études avec des composés qui inhibent l'ostéoclastogénèse ou des composés qui stimulent l'ostéoclastogénèse.

Avec ce système, nous avons essayé de découvrir la participation des COX et des prostaglandines dans l'ostéoclastogénèse humaine. L'inhibition de la COX-2 seule (DFU ou NS-398) ou avec la COX-1 (indométacine et ibuprofène) augmente le nombre de cellules TRAP<sup>+</sup>. L'ostéoclastogénèse, elle, augmente dans les conditions où il y a une diminution des PGs endogènes dans le surnageant des cellules en culture. Les prostaglandines produites par l'activité de la COX-2 ont un effet inhibiteur sur l'ostéoclastogénèse comme il a été démontré par l'addition exogène des prostaglandines lors de l'inhibition des COX par l'indométacine, dont la  $\text{PGE}_2$ . De plus, cet effet agit

principalement par le récepteur EP4, mais aussi par les récepteurs EP1 et TP. En revanche, l'implication du récepteur EP2 n'a pas été clairement définie à ce jour. Nous avons démontré que les prostaglandines qui agissent sur les récepteurs EP1 et TP stimulent la libération de l'OPG dans le milieu de culture. Cette ostéoprotégérine bloque la liaison du RANKL à son récepteur sur les précurseurs ostéoclastiques ce qui diminue la formation de cellules TRAP<sup>+</sup>.

Nous avons aussi démontré que l'inhibition de l'ostéoclastogénèse par le récepteur EP4 n'avait pas pour intermédiaire l'OPG. Cependant, l'inhibition de l'ostéoclastogénèse par le récepteur EP1 et TP avait pour intermédiaire l'OPG. Alors, le récepteur EP4 agit sur l'ostéoclastogénèse dans le système quoique la voie empruntée par EP4 n'ait pas encore été clarifiée. Pour le récepteur TP, nous avons démontré que son activation augmente significativement la concentration d'OPG dans le surnageant. Sachant qu'une augmentation systémique de l'OPG a des propriétés ostéoprotectrices, le récepteur TP devient une cible pharmacologique très intéressante pour des maladies où il y a trop de résorption osseuse comme l'ostéoporose. De plus, l'OPG étant capable d'agir sur l'os sans être produit dans l'os permet d'envisager de cibler un autre organe comme le foie pour produire l'OPG qui peut inhiber la résorption osseuse.

## PERSPECTIVES

### 1. Système d'ostéoclastogénèse

Le système d'ostéoclastogénèse de notre étude est bien différent des autres systèmes décrits jusqu'à maintenant. Notre système ne nécessite pas de dexaméthasone, RANKL ou vitamine D<sub>3</sub> exogènes. Le système d'ostéoclastogénèse de notre étude pourra servir à étudier plusieurs autres conditions d'ostéoclastogénèse induite par des cytokines (IL-1, TNF $\alpha$ ) ou des facteurs de différenciation (M-CSF, GM-CSF, PTH).

### 2. Vérification de nouveaux produits antiostéoclastogénèse

Le système que nous avons développé peut servir pour l'identification de nouveaux produits capables d'inhiber la formation d'ostéoclastes.

#### 2.1 Étude des composés capables de stimuler l'apoptose des ostéoclastes

Un autre aspect du casse-tête de la différenciation qui n'est pas résolu est la disparition des ostéoclastes après avoir accompli leur devoir de résorption. Les évidences disponibles pointent vers un mécanisme apoptotique. Cependant, cet aspect du cycle de vie de l'ostéoclaste n'est pas bien étudié. L'apoptose peut être important dans des mécanismes comme la réduction de la dégradation osseuse causée par les glucocorticoïdes et les estrogènes (DEMPSTER *et al.*, 1997; KAMEDA *et al.*, 1997). Cet aspect a d'ailleurs un potentiel considérable pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques antiostéoporotiques. Comme pour les autres aspects de la biologie de l'ostéoclaste, il est important d'interpréter prudemment les résultats puisqu'il y a coexistence de plusieurs voies de régulation. Par exemple, des travaux démontrent que

les glucocorticoïdes augmentent l'apoptose des ostéoclastes de rats (DEMPSTER *et al.*, 1997). Toutefois, les traitements avec les glucocorticoïdes chez les humains causent une perte de masse osseuse significative (GIANNINI *et al.*, 2002; SAMBROOK, 2002).

Avec le modèle présenté dans cette thèse, il serait facile d'étudier les composés capables de causer la disparition des ostéoclastes. On peut stimuler une forte production des ostéoclastes avec de l'indométacine dans le système des cellules de foie et par la suite changer le milieu de culture avec un milieu contenant les composés à étudier. Le nombre d'ostéoclastes en fonction du temps démontrera les composés capables de diminuer le nombre d'ostéoclastes par rapport aux témoins. Des études semblables pourront démontrer l'effet des agents sur la survie des ostéoclastes ce qui est très important lors de la ménopause puisque la survie des ostéoclastes est accrue.

### **3. Prostaglandines et ostéoprotégérine**

Il a été démontré qu'une seule injection d'OPG réduit rapidement et de façon très efficace le renouvellement osseux pour une période soutenue (BEKKER *et al.*, 2001). La démonstration que l'activation des récepteurs TP augmente l'OPG encourage la recherche de nouveaux produits qui pourrait agir dans un tissu tel que le foie pour augmenter l'OPG circulant et donc agir sur les ostéoclastes de l'os. On pourrait même envisager des thérapies préventives dès l'âge adulte pour assurer une bonne densité osseuse. Cependant, les agonistes TP ne peuvent pas être utilisés à cause des risques de thrombose.



## REMERCIEMENTS

D'abord, je voudrais remercier Dr Artur J. de Brum-Fernandes, mon directeur de recherche, pour sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordée. Je remercie Dr Stankova, Dr Guillemette et Dr. Di Battista pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Par ailleurs, je remercie mes collègues de travail : Patrice Sarrazin, Caroline Patry, Rana Samadfam, Isabelle Fortier, Marie-Claude Miousse, Francis Brière, Francois Bolduc, Drist Rochdi, Carol Richard et Marthe Fillion pour leur collaboration, leurs encouragements et pour l'atmosphère agréable de travail qu'ils ont su créer.

Je tiens à remercier toute l'unité des maladies rhumatismales et le programme d'immunologie pour l'esprit d'unité qui règne dans ces départements.

Je remercie Merck Frosst pour nous avoir fourni le DFU.

Finalement, je remercie les membres de ma famille pour leur support moral et financier ainsi que pour leurs efforts qui m'ont permis de me rendre où je suis aujourd'hui et où je serai demain.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMOVITZ, M., BOIE, Y., NGUYEN, T., RUSHMORE, T.H., BAYNE, M.A., METTERS, K.M., SLIPETZ, D.M. et GRYGORCZYK, R. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human FP receptor. *J Biol Chem* **269** : 2632-2636.
- ADAM, M., BOIE, Y., RUSHMORE, T.H., MULLER, G., BASTIEN, L., MCKEE, K.T., METTERS, K.M. et ABRAMOVITZ, M. (1994) Cloning and expression of three isoforms of the human EP3 prostanoid receptor. *FEBS Lett* **338** : 170-174.
- AKATSU, T., TAKAHASHI, N., DEBARI, K., MORITA, I., MUROTA, S., NAGATA, N., TAKATANI, O. et SUDA, T. (1989) Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res* **4**(1) : 29-35.
- AKATSU, T., MURAKAMI, T., ONO, K., NISHIKAWA, M., TSUDA, E., MOCHIZUKI, S.I., FUJISE, N., HIGASHIO, K., MOTOYOSHI, K., YAMAMOTO, M. et NAGATA, N. (1998) Osteoclastogenesis inhibitory factor exhibits hypocalcemic effects in normal mice and in hypercalcemic nude mice carrying tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Bone*. **23**(6) : 495-498.
- ALMEIDA-PORADA, G., FLAKE, A.W., GLIMP, H.A. et ZANJANI, E.D. (1999) Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* **27**(10) : 1569-1575.
- ALMEIDA-PORADA, G., PORADA, C.D., TRAN, N. et ZANJANI, E.D. (2000) Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep

results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* **95**(11) : 3620-3627.

ALVAREZ, J.I., ROSS, F.P., ATHANASOU, N.A., BLAIR, H.C., GREENFIELD, E.M. et TEITELBAUM, S.L. (1992) Osteoclast precursors circulate in avian blood. *Calcif Tissue Int* **51** : 48-53.

AN, S., YANG, J., XIA, M. et GOETZL, E.J. (1993) Cloning and expression of the EP2 subtype of human receptors for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* **197** : 263-270.

ATHANASOU, N.A. et QUINN, J. (1990) Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons : immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function. *J Clin Pathol* **43** : 997-1003.

ATHANASOU, N.A., ALVAREZ, J.I., ROSS, F.P., QUINN, J.M. et TEITELBAUM, S.L. (1992) Species differences in the immunophenotype of osteoclasts and mononuclear phagocytes. *Calcif Tissue Int* **50** : 427-432.

ATKINS, G.J., HAYNES, D.R., GEARY, S.M., LORIC, M., CROTTI, T.N. et FINDLAY, D.M. (2000) Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone* **26**(6) : 653-661.

BARNETT, J., CHOW, J., IVES, D., CHIOU, M., MACKENZIE, R., OSEN, E., NGUYEN, B., TSING, S., BACH, C. et FREIRE, J. (1994) Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* **1209**(1) : 130-139.

- BARNICOT, N.A. (1947) The supravital staining of osteoclasts with neutral-red : their distribution on the parietal bone of normal growing mice, and a comparison with the mutants grey-lethal and hydrocephalus-3. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **134** : 467-485.
- BARON, R., NEFF, L., TRAN VAN, P., NEFUSSI, J.R. et VIGNERY, A. (1986) Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* **122**(2) : 363-378.
- BASTANI, B., ROSS, F.P., KOPITO, R.R. et GLUCK, S.L. (1996) Immunocytochemical localization of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and Cl<sup>-</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger (erythrocyte band-3 protein) in avian osteoclasts : effect of calcium-deficient diet on polar expression of the H<sup>+</sup>-ATPase pump. *Calcified Tiss Int* **58** : 332-336.
- BASTIEN, L., SAWYER, N., GRYGORCZYK, R., METTERS, K.M. et ADAM, M. (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* **269** : 11873-11877.
- BAUER, D.C., ORWOLL, E.S., FOX, K.M., VOGT, T.M., LANE, N.E., HOCHBERG, M.C., STONE, K. et NEVITT, M.C. (1996) Aspirin and NSAID use in older women : Effect of bone mineral density and fracture risk. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res* **11** : 29-35.
- BEKKER, P.J., HOLLOWAY, D., NAKANISHI, A., ARRIGHI, M., LEESE, P.T. et DUNSTAN, C.R. (2001) The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* **16**(2) : 348-360.

- BERGSTROM, S., RYHAGE, R., SAMUELSSON, B. et SJORALL, J. (1962) The structure of prostaglandin E, F and F<sub>2</sub>. *Acta Chem Scand* **16** : 501-502.
- BIANCO, P. et GEHRON, R.P. (2000) Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* **105** : 1663-1668.
- BLAIR, H.C., TEITELBAUM, S.L., GHISELLI, R. et GLUCK, S. (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245** : 855-857.
- BLAIR, H.C., TEITELBAUM, S.L., KOZIOL, C.M. et SCHLESINGER, P.H. (1991) Passive chloride permeability charge-coupled to the electrogenic H<sup>+</sup>-ATPase of avian osteoclast ruffled membrane. *AM J Physiol* **260** : C1315-C1324.
- BLAIR, H.C., TEITELBAUM, S.L., GROSSO, L.E., LACEY, D.L., TAN, H.-L., McCOURT, D.W. et JEFFREY, J.J. (1993) Extracellular matrix degradation at acid pH : avian osteoclast acid collagenase isolation and characterization. *Biochem J* **290** : 873-884.
- BOIE, Y., SAWEYR, N., SLIPETZ, D.M. METTERS, K.M. et ABRAMOVITZ, M. (1995) Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* **270** : 18910-18916.
- BOIE, Y., RUSHMORE, T.H., DARMON-GOODWIN, A., GRYGORCZYK, R., SLIPETZ, D.M., METTERS, K.M. et ABRAMOVITZ, M. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* **269** : 12173-12178.
- BOSSARD, M.J., TOMASZEK, T.A., THOMPSON, S.K., AMEGADZIE, B.Y., HANNING, C.R., JONES, C., KURDYLA, J.T., MCNULTY, D.E., DRAKE, F.H., GOWEN, M. et LEVY, M.A. (1996) Proteolytic activity of human

- osteoclast cathepsin K, Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271** : 12517-12524.
- BREYER, R.M., DAVIS, L.S., NIAN, C., REDHA, R., STILLMAN, B., JACOBSON, H.R. et BREYER, M.D. (1996) Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP4 receptor. *Am J Physiol* **270** : F485-F493.
- BROWN, E.M., GAMBA, G., RICCARDI, D. LOMBARDI, M., BUTTERS, R., KIFOR, O., SUN, A., HEDIGER, M.A., LYTTON, J. et HEBERT, S.C. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366** : 575-580.
- BURGER, E.H., VAN DER MEER, J.W., VAN DE GEVEL, J.S., GRIBNAU, J.C., THESINGH, G.W. et VAN FURTH, R. (1982) In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **156**(6) : 1604-1614.
- CALPAN, A.L. (1994) The mesengenic process. *Clin Plast Surg* **21** : 429-435.
- CARRASCO, M.P., PHANEUF, S., ASBOTH, G. et LOPEZ BERNAL, A. (1996) Fluprostenol activates phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> mobilization in human myometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **81** : 2104-2110.
- CHAMBERS, T.J. (1978) Multinucleated giant cells. *J Pathol* **126** : 125-148.
- CHAMBERS, T.J., REVELL, P.A., FULLER, K. et ATHANASOU, N.A. (1984) Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* **66** : 383-399.
- CHENU, C., KURIHARA, N., MUNDY, G.R. et ROODMAN, G.D. (1990) Prostaglandin E2 inhibits formation of osteoclastlike cells in long-term human

marrow cultures but is not a mediator of the inhibitory effects of transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* **5**(7) :677-681.

CHOW, J.W. et CHAMBERS, T.J. (1994) Indomethacin has distinct early and late actions in bone formation induced by mechanical stimulation. *Am J Physiol* **267** : E287-E292.

CLIVE, D.M. et STOFF, J.S. (1984) Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* **310**(9) : 563-572.

COCCIA, P.F., KRIVIT, W., CERVENKA, J., CLAWSON, C., KERSEY, J.H., KIM, T.H., NESBIT, M.E., RAMSAY, N.K., WARKENTIN, P.I., TEITELBAUM, S.L., KAHN, A.J. et BROWN, D.M. (1980) Successful bone-marrow transplantation for infantile malignant osteopetrosis. *N Engl J Med* **302**(13) : 701-708.

COLEMAN, R.A. et SHELDRIK, R.L. (1989) Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br J Pharmacol* **96**(3) : 688-692.

COLEMAN, R.A., SMITH, W.L. et NARUMIYA, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* **46**(2) : 205-229.

COLEMAN, R.A, HUMPHREY, P.P.A., KENNEDY, L., LEVY, G.P. et LUMLEY, P. (1981) Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H<sub>2</sub>-analogue, with those of prostaglandin H<sub>2</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> on some isolated smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol.* **73** :773-778.

- COLUCCI, S., GRANO, M., ZIGRINO, P., SANTACROCE, G., ZAMBONIN, G., TETI, A. et ZAMBONIN-ZALLONE, A. (1993) Human osteoclast-like cells recognize laminin via an RGD independent mechanism. *Boll Soc Ital Biol Sper* **69** : 295-300.
- COWLING, G.J. et DEXTER, T.M. (1992) Erythropoietin and myeloid colony stimulating factors. *Tib Tech* **10** : 349-357.
- CRETIN, A. (1951) Contribution histochimique a l'étude de la construction et de la destruction osseuse. *Presse Med* **59** : 1240-1242.
- CRIPPES, B.A., ENGLEMAN, V.W., SETTLE, S.L., DELARCO, J., ORNBERG, R.L., HELFRICH, M.H., HORTON, M.A. et NICKOLS, G.A. (1996) Antibodies to  $\beta_3$  integrin inhibits osteoclast-mediated bone resorption in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* **137** : 918-924.
- CROFFORD, L.J., WILDER, R.L., RISTIMAKI, A.P., SANO, H., REMMERS, E.F., EPPS, H.R. et HLA, T. (1994) Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* **93**(3) : 1095-1101.
- CROUCHER, P.I., SHIPMAN, C.M., LIPPITT, J., PERRY, M., ASOSINGH, K., HIJZEN, A., BRABBS, A.C., VAN BEEK, E.J., HOLEN, I., SKERRY, T.M., DUNSTAN, C.R., RUSSELL, G.R., VAN CAMP, B. et VANDERKERKEN, K. (2001) Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. **98**(13) : 3534-3540.
- CUMANO, A., PAIGE, C., ISCOVE, N. et BRADY, G. (1992) Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature* **356** : 612-615.



- DE BRUM-FERNANDES, A.J., LAPORTE, S., HEROUX, M., LORA, M., PATRY, C., MENARD, H.A., DUMAIS, R. et LEDUC, R. (1994) Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **198**(3) : 955-60.
- DEANS, R.J. et MOSELEY, A.B. (2000) Mesenchymal stem cells : biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28** : 875-884.
- DELAISSÉ, J.-M., LEDENT, P. et VAES, G. (1991) Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue. Cathepsin B (pro)cathepsin L and a cathepsin L-like 70 kDa proteinase. *Biochem J* **279** : 167-174.
- DELAISSÉ, J.-M., EECKHOUT, Y., NEFF, L., FRANÇOIS-GILLET, C.H., HENFIET, P., SU, Y., VAES, G. et BARON, R. (1993) (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci* **106** : 1071-1082.
- DEMPSTER, D.W., MOONGA, B.S., STEIN, L.S., HORBERT, W.R. et ANTAKLY, T. (1997) Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J Endocrinol* **154** : 397-406.
- DEWITT, D.L. (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* **1083**(2) : 121-34.
- DEWITT, D.L., EL-HARITH, E.A., KRAEMER, S.A., ANDREWS, M.J., YAO, E.F., ARMSTRONG, R.L. et SMITH, W.L. (1990) The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* **265**(9) : 5192-5198.

- DUCIE, P., DESBOIS, C., BOYCE, B., PINERO, G., STORY, G., DUNSTAN, C., SMITH, E. BONADIO, J., GOLDSTEIN, S., GUNDBERG, C., BRADLEY, A. et KARSENTY, G. (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382** : 448-452.
- DRAKE, F.H., DODDS, R.A., JAMES, I.E., CONNOR, J.R., DEBOUCK, C., RICHARDSON, S., LEE-RYKACZEWSKI, E., COLEMAN, L., RIEMAN, D., BARTH-LOW, R., HASTINGS, G. et GOWEN, M. (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **271** : 12511-12516.
- EMA, H., DOUAGI, I., CUMANO, A. et KOURILSKY, P. (1998) Development of T cell precursor activity in murine fetal liver. *Eur J Immunol* **28** : 1563-1569.
- EK-RYLANDER, B., BILL, P., NORGARD, M., NILSSON, S. et ANDERSSON, G. (1991) Cloning, sequence, and developmental expression of a type 5, tartrate-resistant, acid phosphatase of rat bone. *J Biol Chem* **266** : 24684-24689.
- FALL, P.M., BREAUULT, D.T. et RAISZ, L.G. (1994) Inhibition of collagen synthesis by prostaglandins in the immortalized rat osteoblastic clonal cell line, Py1a : Structure activity relations and signal transduction mechanisms. *J Bone Miner Res* **9** : 1935-1943.
- FERREIRA, S.H. (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature* **240** : 200-203.
- FISHER, J.E., CAUFFIELD, M.P., SATO, M., QUARTUCCIO, H.A., GOULD, R.J., GARSKY, B.N., RODAN, G.A. et ROSENBLATT, M. (1993) Inhibition of

- osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin an “arginyl-glycyl-aspartyl” (RGD)-containing protein. *Endocrinology* **132** : 1411-1413.
- FLANAGAN, A.M. (1990) The osteoclast, which derive from a haemopoietic stem cell, is not depleted in aplastic anaemia. *J Pathol* **164** : 261-263.
- FLANAGAN, A.M. et CHAMBERS, T.J. (1992) Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandins E1 and E2. *Endocrinology* **130**(1) : 443-448.
- FLETCHER, B.S., KUJUBU, D.A., PERRIN, D.M. et HERSCHMAN, H.R. (1992) Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* **267**(7) : 4338-4344.
- FOURNIER, A., ANDREJAK, M., MAKDASSI, R., FIEVET, P. et SEBERT, J.L. (1986) Renal complications of non-steroidal anti-inflammatory agents. *Presse Med* **15**(17) : 777-779.
- FUJIKAWA, Y., QUINN, J.M., SABOKBAR, A., MCGEE, J.O. et ATHANASOU, N.A. (1996) The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* **137** : 4058-4060.
- FUNK, C.D., FUNK, L.B., KENNEDY, M.E., PONG, A.S. et FITZGERALD, G.A. (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* **5**(9) : 2304-2312.
- FUNK, C.D., FURCI, L., FITZGERALD, G.A., GRYGORCZYK, R., ROCHETTE, C., BAYNE, M.A., ABRAMOVITZ, M., ADAM, M. et METTERS, K.M. (1993)

- Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* **268** : 26767-26772.
- FUTAKI, N., TAKAHASHI, S., YOKOYAMA, M., ARAI, I., HIGUCHI, S. et OTOMO, S. (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* **47**(1) : 55-59.
- GANS, K.R., GABRAIGHT, W., ROMAN, R.J., HABER, S.B., KERR, J.S., SCHMIDT, W.K., SMITH, C., HEWES, W.E. et ACKERMAN, N.R. (1990) Anti-inflammatory and safety profile of DuP 6976, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **254** : 180-187.
- GAO, Y.H., SHINKI, T., YUASA, T., KATAOKA-ENOMOTO, H., KOMORI, T., SUDA, T. et YAMAGUCHI, A. (1998) Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun.* **252**(3) : 697-702.
- GATTEI, V., ALDINUCCI, D., QUINN, J.M., DEGAN, M., COZZI, M., PERIN, V., IULIIS, A.D., JUZBASIC, S., IMPROTA, S., ATHANASOU, N.A., ASHMAN, L.K. et PINTO, A. (1996) Human osteoclasts and preosteoclast cells (FLG 29.1) express functional c-kit receptors and interact with osteoblast and stromal cells via membrane-bound stem cell factor. *Cell Growth Differ* **7** : 753-763.
- GELB, B.D., SHI, G.P., CHAPMAN, H.A. et DESNICK, R.J. (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **272** : 1236-1238.

- GERVAIS, F.G., CRUZ, R.P., CHATEAUNEUF, A., GALE, S., SAWYER, N., NANTEL, F., METTERS, K.M., O'NEILL, G.P. (2001) Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD<sub>2</sub> receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol.*; **108**(6) : 982-988.
- GIANNINI, S., NOBILE, M. et SARTORI, L. (2002) Organ glucocorticoid-induced osteoporosis. *Front Horm Res.* **30** :94-106.
- GIERSE, J.K., HAUSER, S.D., CREELY, D.P., KOBOLDT, C., RANGWALA, S.H., ISAKSON, P.C. et SEIBERT, K. (1995) Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem J* **305** (Pt 2) : 479-484.
- GOTO, T., TSUKUBA, T., KIYOSHIMA, T., NISHIMURA, Y., KATO, K., YAMAMOTO, K. et TANAKA, T. (1993) Immuno-histochemical localization of cathepsins B, D, and L in rat osteoclast. *Histochemistry* **99** : 411-414.
- GORDON, S. (1995) The macrophage. *Bioessays* **17** : 977-986.
- GRANO, M., GALIMI, F., ZAMBONIN, G., COLUCCI, S., COTTONE, E., ZALLONE, A.Z. et COMOGLIO, P.M. (1996) Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 7644-7648.
- GRIGORIADIS, A.R., WANG, Z.Q., CECCHINI, M.G., HOFSTETTER, W., FELIX, R., FLEISCH, H.A. et WAGNER, E.F. (1994) c-Fos : a key regulator of osteoclastmacrophage lineage determinanton and bone remodeling. *Science* **266** : 443-448.

- HARRISON, J.R., KLEINERT, L.M., KELLY, P.L., KREBSBACH, P.H., WOODY, C., CLARKS, S., ROWE, D.W., LICHTER, A.C. et KREAM, B.E. (1998) Interleukin-1 represses COL1A1 promoter activity in calvarial bones of transgenic COLCAT mice in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* **13** : 1076-1083.
- HERSHMAN, H.R. (1992) Characterization of a gene encoding a second prostaglandin synthase/cyclooxygenase (PGS/COX), whose message and protein are induced by mitogens and inhibited by glucocorticoids, The 8th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Montreal, CANADA, 26-31 July, Abstract No.302, pp. 79.
- HIGUCHI, S., TABATA, N., TAJIMA, M., ITO, M., TSURUDOME, M., SUDO, A., UCHIDA, A. et ITO, Y. (1998) Induction of human osteoclast-like cells by treatment of blood monocytes with anti-fusion regulatory protein-1/CD98 monoclonal antibodies. *J. Bone Miner Res* **13** : 44-49.
- HIRATA, M., KAKIZUKA, A., AIZAWA, M., USHIKUBI, F. et NARUMIYA, S. (1994) Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 11192-11196.
- HIRATA, M., HAYASHI, YL, USHIKUBI, F., YOKOTA, Y., KAGEYAMA, R., NAKANISHI, S. et NARUMIYA, S. (1991) Cloning and expression of cDNA for human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature* **349** : 617-620.
- HIRAYAMA, T., SABOKBAR, A. et ATHANASOU, N.A. (2002) Effect of corticosteroids on human osteoclast formation and activity. *J Endocrinol*

**175(1):155-163.**

HLA, T. et NEILSON, K. (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89(16)** : 7384-7388.

HOFBAUER, L.C. et HEUFELDER, A.E. (1998) Osteoprotegerin and its cognate ligand: a new paradigm of osteoclastogenesis. *Eur J Endocrinol* **139(2)** : 152-154.

HOLLYDAY, L.S., WELGUS, H.G., FLISZAR, C.J., VEITH, G.M., JEFFREY, J.J. et GLUCK, S.L. (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J.Biol Chem* **272** : 22053-22058.

HOLTROP, M.E. et KING, G.J. (1977) The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop* **123** : 177-196.

HONDA, A., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., WATABE, A., IRIE, A., NEGISHI, M., NARUMIYA, S. et ICHIKAWA, A. (1993) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* **268** : 7759-7762.

HUNTER, S.J., ROSEN, C.J. et GAY, C.V. (1991) In vitro resorption activity of isolated chick osteoclasts : effects of carbonic anhydrase inhibition. *J Bone Min Res* **6** : 61-66.

HURLEY, M.M., LEE, S.K., RAISZ, L.G., BERNECKER, P. et LORENZO, J. (1998) Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone* **22** : 309-316.

IKUTA, K., KINA, T., MACNEIL, I., UCHIDA, N., PEAULT, B., CHIEN, Y.H. et WEISSMAN, I.L. (1990) A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* **62(5)** : 863-874.

- INAOKA, T., BILBE, G., ISHIBASHI, O., TEZUKA, K., KUMEGAWA, M. et KAKUBO, T. (1995) Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K : novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun* **206** : 89-96.
- ITO, S., NEGISHI, M., SUGAMA, K., OKUDA-ASHITAKA, E. et HAYAISHI, O. (1990) Signal transduction coupled to prostaglandin D<sub>2</sub>. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* **21** : 371-374.
- JEE, W.S., UENO, K., DENG, Y.P. et WOODBURY, D.M. (1985) The effects of prostaglandin E2 in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcif Tissue Int* **37**(2) : 148-157.
- JEFFCOAT, M.K., REDDY, M.S., HAIGH, S., BUCHANAN, W., DOYLE, M.J., MEREDITH, M.P., NELSON, S.L., GOODALE, M.B. et WEHMEYER, K.R. (1995) A comparison of topical ketorolac, systemic flurbiprofen, and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis. *J Periodontol* **66** : 329-338.
- JILKA, R.L. (1986b) Are osteoblastic cells required for the control of osteoclast activity by parathyroid hormone? *Bone Miner* **1**(4) : 261-266.
- JILKA, R.L. (1986A) Parathyroid hormone-stimulated development of osteoclasts in cultures of cells from neonatal murine calvaria. *Bone* **7**(1) : 29-40.
- JIMI, E., NAKAMURA, I., AMANO, H., TAGUCHI, Y., TSURUKAI, T., TAMURA, M., TAKAHASHI, N. et SUDA, T. (1996) Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell to cell contact. *Endocrinology* **137** : 2187-2190.



- JOHNSON, G. et MOORE, M. (1975) Role of stem cell migration in initiation of mouse fetal liver hemopoiesis. *Nature* **258** : 726-728.
- JOTEREAU, F.V. et LE DOUARIN, N.M. (1978) The developmental relationship between osteocytes and osteoclasts : a study using the quailchick nuclear marker in endochondral ossification. *Dev Biol* **63** : 253-265.
- KAHN, A.J. et SIMMONS, D.J. (1975) Investigation of cell lineage in bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue. *Nature* **258** : 325-327.
- KAHN, A.J., STEWART, C.C. et TEITELBAUM, S.L. (1978) Contact-mediated bone resorption by human monocytes in vitro. *Science* **199** : 988-990.
- KAJI, H., SUGIMOTO, T., KANATANI, M. et CHIHARA, K. (1996b) High extracellular calcium stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity in the presence of osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* **11**(7) : 912-920.
- KAJI, H., SUGIMOTO, T., KANATANI, M., NASU, M. et CHIHARA, K. (1996a) Estrogen blocks parathyroid hormone (PTH)-stimulated osteoclast-like cell formation by selectively affecting PTH-responsive cyclic adenosine monophosphate pathway. *Endocrinology*. **137**(6) : 2217-2224.
- KAJI, H., SUGIMOTO, T., KANATANI, M., FUKASE, M., KUMEGAWA, M. et CHIHARA, K. (1996c) Prostaglandin E2 stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: role of cAMP-dependent protein kinase. *J Bone Miner Res* **11**(1) : 62-71.
- KAJI, H., SUGIMOTO, T., KANATANI, M., NISHIYAMA, K., CHIHARA, K. (1997) Dexamethasone stimulates osteoclast-like cell formation by directly acting on

hemopoietic blast cells and enhances osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Bone Miner Res.* **12**(5) : 734-741.

KAMEDA, T., MANO, H., YUASA, T., MORI, Y., MIYAZAWA, K., SHIOKAWA, M., NAKAMARU, Y., HIROI, E., HIURA, K., KAMEDA, A., YANG, N.N., HAKEDA, Y. et KUMEGAWA, M. (1997) Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* **186** : 489-495.

KANEMATSU, M., SATO, T., TAKAI, H., WATANABE, K., IKEDA, K. et YAMADA, Y. (2000) Prostaglandin E<sub>2</sub> induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegrin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res.* **15**(7) : 1321-1329.

KATSUYAMA, M., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., IRIE, A., NEGISHI, M., NARUMIYA, S. et ICHIKAWA, A. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* **344** : 74-78.

KAWAGUCHI, H., PILBEAM, C.C., VARGAS, S.J., MORSE, E.E., LORENZO, J.A. et RAISZ, L.G. (1995a) Ovariectomy enhances and estrogen replacement inhibits the activity of bone marrow factors that stimulate prostaglandin production in cultured mouse calvariae. *J Clin Invest* **96**(1) : 539-548.

KAWAGUCHI, H., PILBEAM, C.C., HARRISON, J.R. et RAISZ, L.G. (1996) The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* **313** : 36-46.

KJAERGAARD, P., NAFEI, A., TEICHERT, G., KRISTENSEN, O., SCHMIDT, S.A., KELLER, J. et LUCHT, U. (1993) Indomethacin for prevention

of heterotopic ossification- A randomized controlled study in 41 hip arthroplasties. *Acta Orthop Scand* **64** : 639-642.

KLEIN-NULEND, J., BURGER, E.H., SEMEINS, C.M., RAISZ, L.G. et PILBEAM, C.C. (1997) Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. *J Bone Miner Res* **12** : 45-51.

KODAMA, H., NOSE, M., NIIDA, S. et YAMASAKI, A. (1991) Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* **173**(5) : 1291-1294.

KOIDE, M., MURASE, Y., YAMATO, K., NOGUCHI, T., OKAHASHI, N., et NISHIHARA, T. (1999) Bone morphogenetic protein-2 enhances osteoclast formation mediated by interleukin-1alpha through upregulation of osteoclast differentiation factor and cyclooxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun* **259**(1):97-102.

KOTANI, M., TANAKA, I., OGAWA, Y., USUI, T., MORI, K., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., YOSHIMI, T. et NAKAO, K. (1995) Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing : Multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol Pharmacol* **48** : 869-879.

KUJUBU, D.A., FLETCHER, B.S., VARNUM, B.C., LIM, R.W. et HERSCHMAN, H.R. (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* **266**(20) : 12866-12872.

- KUNAPOLI, S.P., FEN MAO, G.F., BASTEPE, M., LIU-CHEN, L.Y., LI, S., CHEUNG, P.P., DERIEL, J.K. et ASHBY, B. (1994) Cloning and expression of a prostaglandin E receptor EP3 subtype from erythroleukaemia cells. *Biochem J* **298** : 263-267.
- KURIHARA, N., CHENU, C., MILLER, M., CIVIN, C. et ROODMAN, G.D. (1990) Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology* **126**(5) : 2733-2741.
- LACEY, D.L., TIMMS, E., TAN, H.L., KELLEY, M.J., DUNSTAN, C.R., BURGESS, T., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., ELLIOTT, G., SCULLY, S., HSU, H., SULLIVAN, J., HAWKINS, N., DAVY, E., CAPPARELLI, C., ELI, A., QIAN, Y.X., KAUFMAN, S., SAROSI, I., SHALHOUB, V., SENALDI, G., GUO, J., DELANEY, J. et BOYLE, W.J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**(2) : 165-176.
- LADDER, C.S. et FLANAGAN, A.M. (1998) Prostaglandin E2, interleukin-1, and tumor necrosis factor- increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* **139** : 3157-3164.
- LAITALA-LEINONEN, T., HOWELL, M.L., DEAN, G.E. et VAANANEN, H.K. (1996) Resorption-cycle-dependent polarization of mRNAs for different subunits of V-ATPase in bone-resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* **7** : 129-142.
- LEE, S.K., GOLDRING, S.R. et LORENZO, J.A. (1995) Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* **136**(10) : 4572-4581.

- LEES, R.L., SABHARWAL, V.K. et HEERSCHKE, J.N. (2001) Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. *Bone* 28(2) : 187-194.
- LI, Y.P., ALEXANDER, M., WUCHERPFENNIG, A.L., YELICK, P., CHEN, W. et STASHENKO, P. (1995) Cloning and complete coding sequence of a novel human cathepsin expressed in giant cells of osteoclastomas. *J Bone Miner Res* 10 : 1197-1202.
- LI, X., OKADA, Y., PILBEAM, C.C., LORENZO, J.A., KENNEDY, C.R., BREYER, R.M. et RAISZ, L.G. (2000) Knockout of the murine prostaglandin EP2 receptor impairs osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 141(6) : 2054-2061.
- LIEL, N., MAIS, D.E. et HALUSKA, P.V. (1987) Binding of a thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> agonist [<sup>3</sup>H]U46619 to washed human platelets. *Prostaglandins* 33 : 789-797.
- LIPTON, A., ALI, S.M., LEITZEL, K., CHINCHILLI, V., WITTERS, L., ENGLE, L., HOLLOWAY, D., BEKKER, P. et DUNSTAN CR. (2002) Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 8(7):2306-2310.
- LORA, M., MORISSET, S., MENARD, H.A., LEDUC, R. et de BRUM-FERNANDES, A.J. (1997) Expression of recombinant human cyclooxygenase isoenzymes in transfected COS-7 cells in vitro and inhibition by tenoxicam, indomethacin and aspirin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 56(5) : 361-367.

- LORA, M., DENAULT, J.B., LEDUC, R. et de BRUM-FERNANDES, A.J. (1998) Systematic pharmacological approach to the characterization of NSAIDs. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. **59**(1) : 55-62.
- MANOLAGAS, S.C. et JILKA, R.L. (1995) Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* **332** : 305-311.
- MARKS, S.C. et POPOFF, S. (1988) Bone cell biology : the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* **183** : 1-44.
- MARTIN, T.J. et NG, K.W. (1994) Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biochem* **56**(3) : 357-366.
- MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., ZWEIFEL, B. et NEEDLEMAN, P. (1992) Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9) : 3917-3921.
- MASFERRER, J.L., ZWEIFEL, B.S., MANNING, P.T., HAUSER, S.D., LEAHY, K.M., SMITH, W.G., ISAKSON, P.C. et SEIBERT, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8) : 3228-3232.
- MASFERRER, J.L., ZWEIFEL, B.S., SEIBERT, K. et NEEDLEMAN, P. (1990) Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* **86**(4) : 1375-1379.
- MATAYOSHI, A., BROWN, C., DIPERSIO, J.F., HAUG, J., ABU-AMER, Y., LIAPIS, H., KUESTNER, R. et PACIFICI, R. (1996) Human blood-mobilized

hematopoietic precursors differentiate into osteoclasts in the absence of stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 10785-10790.

MATSUZAKI, K., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., YAMAGUCHI, K., YASUDA, H., SHIMA, N., MORINAGA, T., TOYAMA, Y., YABE, Y., HIGASHIO, K. et SUDA, T. (1998) Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* **246**(1) : 199-204.

MBALAVIELE, G., ORCEL, P., MORIEUX, C., NIJWEIDE, P.J. et DE VERNEJOUL, M.C. (1995) Osteoclast formation from human cord blood mononuclear cells co-cultured with mice embryonic metatarsals in the presence of M-CSF. *Bone* **16** : 171-177.

MEADE, E.A., SMITH, W.L. et DEWITT, D.L. (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **268**(9) : 6610-6614.

MIN, H., MORONY, S., SAROSI, I., DUNSTAN, C.R., CAPPARELLI, C., SCULLY, S., VAN, G., KAUFMAN, S., KOSTENUK, P.J., LACEY, D.L., BOYLE, W.J. et SIMONET, W.S. (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* **192**(4) : 463-474.

MIN, Y.K., RAO, Y., OKADA, Y., RAISZ, L.G. et PILBEAM, C.C. (1998) Regulation of prostaglandin G/H synthase-2 expression by interleukin-1 in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* **13** : 1066-1075.

MISRA, M., SOYKA, L.A., MILLER, K.K., HERZOG, D.B., GRINSPOON, S., DE

- CHEN, D., NEUBAUER, G. et KLIBANSKI, A. (2003) Serum osteoprotegerin in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8):3816-3822.
- MIYAURA, C., INADA, M., SUZAWA, T., SUGIMOTO, Y., USHIKUBI, F., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S. et SUDA, T. (2000) Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. *J Biol Chem*. **275**(26) : 19819-19823.
- MIYAURA, C., KUSANO, K., MASUZAWA, T., CHAKI, O., ONOE, Y., AOYAGI, M., SASAKI, T., TAMURA, T., KOISHIHARA, Y. et OHSUGI, Y.(1995) Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res* **10**(9) : 1365-1373.
- MIZUNO, A., AMIZUKA, N., IRIE, K., MURAKAMI, A., FUJISE, N., KANNO, T., SATO, Y., NAKAGAWA, N., YASUDA, H., MOCHIZUKI, S., GOMIBUCHI, T., YANO, K., SHIMA, N., WASHIDA, N., TSUDA, E., MORINAGA, T., HIGASHIO, K. et OZAWA, H. (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* **247**(3) : 610-615.
- MOORE, M.A.S. et METCALF, D. (1970) Ontogeny of the hemopoietic system : yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* **18** : 279-296.
- MORI, K., TANAKA, I., KOTANI, M., MIYAOKA, F., SANDO, T., MURO, S., SASAKI, Y., NAKAGAWA, O., OGAWA, Y., USUI, T., OZAKI, S., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S. et NAKAO, K. (1996) Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP4 subtype : Differential regulation in



- monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester. *J Mol Med* **74** : 333-336.
- MORRISON, S.J., HEMMATI, H.D., WANDYCH, A.M. et WEISSMAN, I.L. (1995)  
The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** : 10302-10306.
- MOSS, M.L. (1965) The biology of the acellular bone of teleost fish. *Acta Anat* **60** : 62-276.
- MÜLLER, A.M., MEDVINSKY, A., STROUBOULIS, J., GROSVELD, F. et  
DZIERZAK, E. (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1** : 291-301.
- MUNDY, G.R. (1987) Bone resorption and turnover in health and disease. *Bone* **8** Suppl 1 : S9-S16.
- NAKAGAWA, O., TANAKA, I., USUI, T., HARADA, M., SASAKI, Y., ITOH, H.,  
YOSHIMASA, T., NAMBA, T., NARUMIYA, S. et NAKAO, K. (1994)  
Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. *Circulation* **90** : 1643-1647.
- NAKAMURA, I., TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N., MORIYAMA, Y.,  
KUROKAWA, T., JIMI, E., SASAKI, T. et SUDA, T. (1997) Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice. *FEBS Lett* **401** : 207-212.
- NAMBA, T., OIDA, H., SUGIMOTO, Y., KAKIZUKA, A., NEGISHI, M.,  
ICHIKAWA, A. et NARUMIYA, S. (1994) cDNA cloning of a mouse

prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression thymic medulla. *J Biol Chem* **269** : 9986-9992.

NAMBA, T., SUGIMOTO, YL, HIRATA, M., HAYASHI, Y., HONDA, A., WATABE, A., NEGISHI, M., ICHIKAWA, A. et NARUMIYA, S. (1992) Mouse thromboxane A2 receptor : cDNA cloning, expression and Northern blot analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **184** : 1197-1203.

NEALE, S.D., SMITH, R., WASS, J.A. et ATHANASOU, N.A. (2000) Osteoclast differentiation from circulating mononuclear precursors in Paget's disease is hypersensitive to 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and RANKL. *Bone* **27**(3) : 409-416.

NEMOTO, K., PILBEAM, C.C., BILAK, S.R. et RAISZ, L.G. (1997) Molecular cloning and expression of a rat prostaglandin E<sub>2</sub> receptor of the EP2 subtype. *Prostaglandins* **54** : 713-725.

NEMOTO, K., BEMECKER, P.M., PILBEAM, C.C. et RAISZ, L.G. (1995) Expression and regulation of protaglandin F receptor mRNA in rodent osteoblastic cells. *Prostaglandins* **59** : 349-358.

NISHIGAKI, N., NEGISHI, M., HONDA, A., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., NARUMIYA, S. et ICHIKAWA, A. (1995) Identification of prostaglandin E receptor EP2 cloned from mastocytoma cells as EP4 subtype. *FEBS Lett* **364** : 339-341.

NOORT, W.A., KRUISSELBRINK, A.B., IN'T ANKER, P.S., KRUGER, M., VAN BEZOOIJEN, R.L., DE PAUS, R.A., HEEMSKERK, M.H., LOWIK, C.W., FALKENBURG, J.H., WILLEMZE, R. et FIBBE, W.E. (2002) Mesenchymal

stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* **30**(8) : 870-878.

O'BANION, M.K., SADOWSKI, H.B., WINN, V. et YOUNG, D.A. (1991) A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* **266**(34) : 23261-23267.

O'BANION, M.K., WINN, V.D. et YOUNG, D.A. (1992) cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11) : 4888-4892.

O'BANION, M.K., WINN, V.D. et YOUNG, D.A. (1992) grIPGHS: a second cyclooxygenase gene responsive to glucocorticoids, growth factors, and cytokines, The 8th International Conference of Prostaglandins and Related Compounds, Montreal, Canada, 26-31 July, Abstract No.305, pp. 79.

OKADA, Y., PILBEAM, C., RAISZ, L. et TANAKA, Y. (2003) Role of cyclooxygenase-2 in bone resorption. *J UOEH* **25**(2):185-195.

OKADA, Y., LORENZO, J.A., FREEMAN, A.M., TOMITA, M., MORHAM, S.G., RAISZ, L.G. et PILBEAM, C.C. (2000) Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. *J Clin Invest* **105**(6):823-832.

OLIVA, D. et NICOSIA, S. (1987) PGI<sub>2</sub>-receptors and molecular mechanisms in platelets and vasculature : State of the art. *Pharmacol Res Commun* **19** : 735-765.

ONO, K., AKATSU, T., MURAKAMI, T., NISHIKAWA, M., YAMAMOTO, M., KUGAI, N., MOTOYOSHI, K. et NAGATA, N. (1998) Important role of EP4, a

subtype of prostaglandin (PG) E receptor in osteoclast-like cell formation from mouse bone marrow cells induced by PGE<sub>2</sub>. *J Endocrinol* **158** : R1-R5.

PARDANAUD, L., YASSINE, F. et DIETERLEN-LIÈVRE, F. (1989) Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and hemopoiesis during avian ontogeny. *Development* **105** : 473-485.

PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C., JAISWAL, R.K., DOUGLAS, R., MOSCA, J.D., MOORMAN, M.A., SIMONETTI, D.W., CRAIG, S. et MARSHAK, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**(5411) : 143-147.

PICOT, S., PEYRON, F., DONADILLE, A., VUILLEZ, J.P., BARBE, G. et AMBROISE-THOMAS, P. (1993) Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. *Immunology* **80**(1) : 127-133.

PILBEAM, C.C., HARRISON, J.R. et RAISZ, L.G. (1996) Prostaglandins and bone metabolism. Dans Bilezikian J.P, RAISZ, L.G., RODAN, D.A., Eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, CA : Academic Press : 715-728.

PILBEAM, C.C., RAISZ, L.G., VOZNESENSKY, O., ALANDER, C.B., DELMAN, B.N. et HAWAGUCHI, H. (1995) Autoregulation of inducible prostaglandin G/H synthase in osteoblastic cells by prostaglandins. *J Bone Miner Res* **19** : 406-414.

PILBEAM, C.C., KAWAGUCHI, H., HAKEDA, Y., BOZNESENSKY, O., ALANDER, C.B. et RAISZ, L.G. (1993) Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **268** : 25643-25649.

- PILBEAM, C.C., RAISZ, L.G., VOZNESENSKY, O., ALANDER, C.B., DELMAN, B.N. et KAWAGUCHI, H. (1995) Autoregulation of inducible prostaglandin G/H synthase in osteoblastic cells by prostaglandins. *J Bone Miner Res* **10** : 406-414.
- PROKOP, D.J. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276** :71-74.
- QUINN, J.M.W., MATSUMURA, Y., TARIN, D., MCGEE, J.O. et ATHANASOU, N.A. (1994) Cellular and hormonal mechanism associated with malignant bone resorption. *Lab Invest* **71** : 465-471.
- QUINN, J.M.W., SABOKBAR, A., DENNE, M., DE VERNEJOL, M.C., MCGEE, J.O. et ATHANASOU, N.A. (1997) Inhibitory and stimulatory effects of prostaglandines on osteoclast differentiation. *Calcif Tiss Int* **60** : 73-70.
- QUINN, J.M., HORWOOD, N.J., ELLIOTT, J., GILLESPIE, M.T., MARTIN, T.J. (2000) Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.* **15**(8) : 1459-66.
- RACHOWDHURY, M.K., YUKAWA, M., COLLINS, L.J., MCGRAIL, S.H., KENT, K.C. et WARE, J.A. (1994) Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* **269** : 19256-19261.
- RAISZ, L.G. (1984) Studies on bone formation and resorption in vitro. *Horm Res* **20**(1) : 22-27.
- RAISZ, L.G. (1999) Prostaglandins and bone : physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis and Cartilage* **7** : 419-421.

- RAYMOND, V., LEUGN, P.C.K. et LABRIE, F. (1983) Stimulation by prostaglandin  $F_{2\alpha}$  of phosphatidic acid-phosphatidylinositol turnover in rat luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 116 : 39-46.
- REGAN, J.W., BAILEY, T.J., PEPPERL, D.J., PIERCE, K.L., BOGARDUS, A.M., DONELLO, J.E., FAIRBAIRN, C.E., KEDZIE, K.M., WOODWARD, D.F. et GIL, D.W. (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* 46 : 213-220.
- RIENDEAU, D., PERCIVAL, M.D., BOYCE, S., BRIDEAU, C., CHARLESON, S., CROMLISH, W., ETHIER, D., EVANS, J., FALGUEYRET, J.P., FORD-HUTCHINSON, A.W., GORDON, R., GREIG, G., GRESSER, M., GUAY, J., KARGMAN, S., LEGER, S., MANCINI, J.A., O'NEILL, G., OUELLET, M., RODGER, I.W., THERIEN, M., WANG, Z., WEBB, J.K., WONG, E., XU, L., YOUNG, R.N., ZAMBONI, R., PRASIT, P. et CHAN, C.C. (1997) Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 121(1) : 105-117.
- RIES, W.L., GONG, J.K. et Gunsolley, J.C. (1987) The distribution and kinetics of nuclei in rat osteoclasts. *Cell Tissue Kinet.* 20(1) : 1-14.
- RINGEL, R.E., BRENNER, J.I., HANEY, P.J., BURNS, J.E., MOULTON, A.L. et BERMAN, M.A. (1982) Prostaglandin-induced periostitis: a complication of long-term PGE1 infusion in an infant with congenital heart disease. *Radiology* 142(3) : 657-658.

- ROBEY, P.G. (1996) Vertebrate mineralized matrix proteins : structure and function. *Connect Tissue Res* **35** : 131-136.
- ROSS, F.P., CHAPPEL, J., ALVAREZ, J.I., SANDER, D., GUTLER, W.T., FARACH-CARSON, M.C., MINTZ, K.A., ROBEY, P.G., TEITELBAUM, S.L. et CHERESH, D.A. (1993) Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin  $\alpha_v\beta_3$  potentiate bone resorption. *J Biol Chem* **268** : 9901-9907.
- ROWE, D.J. et HAUSMANN, E. (1977) Quantitative analyses of osteoclast changes in resorbing bone organ cultures. *Calcif Tissue Res.* **23**(3) : 283-289.
- SAGINARIO, C., QIAN, H.Y. et VIGNERY, A. (1995) Identification of an inducible surface molecule specific to fusing macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 12210-12214.
- SAKAMOTO, K., EZASHI, T., MIWA, K., OKUDA-ASHITAKA, E., HOUTANI, T., SUGIMOTO, T., ITO, S. et HAYAISHI, O. (1994) Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2a receptor. *J Biol Chem* **269** : 3881-3886.
- SAKUMA, Y., TANAKA, K., SUDA, M., KOMATSU, Y., YASODA, A., MIURA, M., OZASA, A., NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., USHIKUBI, F. et NAKAO, K. (2000) Impaired bone resorption by lipopolysaccharide in vivo in mice deficient in the prostaglandin E receptor EP4 subtype. *Infect Immun* **68**(12) : 6819-6825.
- SAKUMA, Y. TANAKA, K., SUDA, M., YASODA, A., NATSUI, K., TANAKA, I., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S., SEGI, E., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A. et

- NAKAO, K. (2000) Crucial involvement of the EP4 sybtype pf prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res* **15** : 218-227.
- SAMBROOK, P.N. (2002) Glucocorticoid osteoporosis. *Curr Pharm Des.* **8** (21): 1877-83.
- SANO, H., HLA, T., MAIER, J.A., CROFFORD, L.J., CASE, J.P., MACIAG, T. et WILDER, R.L. (1992) In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* **89**(1) : 97-108.
- SARRAZIN, P. et de BRUM-FERNANDES, A.J. (soumis).
- SATO, T., FOGED, N.T. et DELAISSE, J.M. (1998) The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Miner Res* **13** : 59-66.
- SCHLESINGER, P.H., BLAIR, H.C., TEITELBAUM, S.L. et EDWARDS, J.C. (1997) Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J Biol Chem* **272** : 18636-18643.
- SCHMID, A., THIERAUCH, K.-H., SCHLEUNING, W.D. et DINTER, H. (1995) Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Eur J Biochem* **228** : 23-30.
- SCUTT, A., BERTAM, P. et BRAUTIGAM, M. (1996) The role of glucocorticoids and prostaglandin E<sub>2</sub> in the recrutement of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage : Possitive and negative effects. *Calcif Tiss Int* **59** : 154-162.



- SEBASTIEN, A., HARRIS, S.T., OTTAWAY, J.H., TODD, K.M. et MORRIS, R.C. (1994) Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal women treated with potassium bicarbonate. *N Engl J Med* **330** : 1776-1781.
- SEGI, E., SUGIMOTO, Y., YAMASAKI, A., AZE, Y., OIDA, H., NISHIMURA, T., MURATA, T., MATSUOKA, T., USHIKUBI, F., HIROSE, M., TANAKA, T., YOSHIDA, N., NARUMIYA, S. et ICHIKAWA, A. (1998) Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(1) : 7-12.
- SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K., HAUSER, S., MASFERRER, J., PERKINS, W., LEE, L. et ISAKSON, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25) : 12013-12017.
- SHIMOKAWA, T. et SMITH, W.L. (1992) Prostaglandin endoperoxide synthase. The aspirin acetylation region. *J Biol Chem* **267**(17) : 12387-12392.
- SIMINIA, T. et DIJKSTRA, C.D. (1986) The origin of osteoclasts : an immunohistochemical study on macrophages and osteoclasts in embryonic rat bone. *Calcif Tissue Int* **39** : 263-266.
- SIMONET, W.S., LACEY, D.L., DUNSTAN, C.R., KELLEY, M., CHANG, M.S., LUTHY, R., NGUYEN, H.Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H.L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T.M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P. et BOYLE, W.J. (1994) Osteoprotegerin: a novel secreted protein with osteoclast-inhibitory activity. *Science* **267** : 387-390.

- W.J. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**(2) : 309-319.
- SIROIS, J. et RICHARDS, J. S. (1992) Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* **267** : 6382-6388.
- SLY, W.S. (1991) Carbonic anhydrase type II deficiency syndrome. Dans S. Dodgson, R.E. Tasjian, G. Gros, N.D. Carter (eds) : *The Carbonic Anhydrases*. New York : Plenum Press, pp 183-207.
- SMITH, W.L. (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* **263**(2 Pt 2) : F181-91.
- SOLOMON, L.M., JUHLIN, L. et KIRCHENBAUM, M.B. (1968) Prostaglandins on cutaneous vasculature. *J Invest Derm* **51** : 280-282.
- SONE, K., TASHIRO, M., FUJINAGA, T., TOMOMASA, T., TOKUYAMA, K. et KUROUME, T. (1980) Long-term low-dose prostaglandin E1 administration. *J Pediatr* **97**(5) : 866-867.
- SUDA, M., TANAKA, K., YASUDA, A., NATSUI, K., SAKUMA, Y., TANAKA, I., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S. et NAKAO, K. (1998) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) autoamplifies its production through EP1 subtype of PGE receptor in mouse osteoblastic MC3T3-E1. *Calcified Tiss Int* **62** : 327-331.
- SUDA, T., NAKAMURA, I., JIMI, E. et TAKAHASHI, N. (1997a) Regulation of osteoclast function. *J. Bone Miner Res* **12** : 869-879.

- SUDA, T., JIMI, E., NAKAMURA, I. et TAKAHASHI, N. (1997) Role of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast differentiation and function. *Methods Enzymol* **282** : 223-235.
- SUGIMOTO, Y., HASUMOTO, K., NAMBA, T., IRIE, A., KATSUYAMA, M., NEGISHI, M., KAKIZUKA, A., NARUMIYA, S. et ICHIKAWA, A. (1994) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J Biol Chem* **269** : 1356-1360.
- TAI, H., MIYAURA, C., PILBEAM, C.C., TAMURA, T., OHSUGI, Y., KOISHIHARA, Y., KUBODERA, N., KAWAGUCHI, H., RAISZ, L.G. et SUDA, T. (1997) Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology* **138** : 2372-2379.
- TAKAI, H., KANEMATSU, M., YANO, K., TSUDA, E., HIGASHIO, K., IKEDA, K., WATANABE, K. et YAMADA, Y. (1998) Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* **273**(42) : 27091-27096.
- TAKAHASHI, N., YAMANA, H., YOSHIKI, S., ROODMAN, G.D., MUNDY, G.R., JONES, S.J., BOYDE, A. et SUDA, T. (1988) Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* **122**(4) : 1373-1382.
- TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N., TANAKA S., MURAKAMI, H., OWAN, I., TAMURA, T. et SUDA, T. (1994) Postmitotic osteoclast precursors are

mononuclear cells which express macrophage-associated phenotype. *Dev Biol* **163** : 212-221.

TAKANASHI, H., MATSUIISHI, T. et YOSHIZATO, K. (1994) Establishment and characterization of stromal cell lines that support differentiation of murine hematopoietic blast cells into osteoclast-like cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **30A(6)** : 384-393.

TAKUMA, A., KANEDA, T., SATO, T., NINOMIYA, S., KUMEGAWA, M., et HAKEDA, Y. (2003) Dexamethasone enhances osteoclast formation synergistically with transforming growth factor-beta by stimulating the priming of osteoclast progenitors for differentiation into osteoclasts. *J Biol Chem* **278(45)** : 44667-44674.

TETI, A., COLUCCI, S., GRANO, M., ARGENTINO, L. et ZAMBONIN-ZALLONE, A. (1992) Protein kinase C affects microfilaments, bone resorption, and  $[Ca^{2+}]_o$  sensing in cultured osteoclasts. *Am J Physiol* **263** : C130-C139.

TETI, A., BLAIR, H.C., TEITELBAUM, S.L., KAHN, A.J., KOZIOL, C., KONSEK, J., ZAMBONIN-ZALLONE, A. et SCHLESINGER, P.H. (1989) Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts. *J Clin Invest* **83** : 227-233.

TEZUKA, K., TEZUKA, Y., MAEJIMA, A., SATO, T., NEMOTO, K., KAMIOKA, H., HAKEDA, Y. et KUMEGAWA, M. (1994) Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* **269** : 1106-1109.

- THOMETZ, J.G. et DIRAIMONDO, C.A. (1996) A case of recurrent Caffey's disease treated with naproxen. *Clin Orthop* **323** : 304-309.
- THORSEN, K., KRISTOFFERSSON, A.O., LERNER, U.H. et LORENTZON, R.P. (1996) In situ microdialysis in bone tissue. Stimulation of prostaglandin E2 release by weight-bearing mechanical loading. *J Clin Invest* **98** : 2446-2449.
- TOKUSHIMA, T., SATO, T., MORITA, I. et MUROTA, S. (1997) Involvement of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in osteoclast formation induced by parathyroid hormone. *Adv Exp Med Biol* **433** : 307-309.
- TONDRAVI, M.M., MCKERCHER, S.R., ANDERSON, K., ERDMANN, J.M., QUIROZ, M., MAKI, R. et TEITELBAUM, S.L. (1997) Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* **385** : 81-84.
- TOMITA, M., LI, X., OKADA, Y., WOODIEL, F.N., YOUNG, R.N., PILBEAM, C.C. et RAISZ, L.G. (2002) Effects of selective prostaglandin EP4 receptor antagonist on osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Bone* **30**(1) : 159-163.
- TONG, H.S., SAKAI, D.D., SIMS, S.M., DIXON, J., YAMIN, M., GOLDRING, S.R., SNEAD, M.L. et MINKIN, C. (1994) Murine osteoclasts and spleen cell polykaryons are distinguished by mRNA phenotyping. *J Bone Miner Res* **9** : 577-584.
- TSUKII, K., SHIMA, N., MOCHIZUKI, S., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., YANO, K., SHIBATA, O., UDAGAWA, N., YASUDA, H., SUDA, T. et HIGASHIO, K. (1998) Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3,

prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone.

Biochem Biophys Res Commun **246**(2) : 337-341.

UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T., TANAKA, H., SASAKI, T., NISHIHARA, T., KOGA, T., MARTIN, T.J. et SUDA, T. (1990) Origin of osteoclasts : mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci USA **87**(18) : 7260-7264.

UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T., SASAKI, T., YAMAGUCHI, A., KODAMA, H., MARTIN, T.J. et SUDA, T. (1989) The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. Endocrinology **125**(4) : 1805-1813.

UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., KATAGIRI, T., TAMURA, T., WADA, S., FINDLAY, D.M., MARTIN, T.J., HIROTA, H., TAGA, T. et KISHIMOTO, T. (1995) Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. J Exp Med **182**(5) : 1461-1468.

VANE, J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature - New Biology **231**(25) : 232-235.

VANE, J.R. et BOTTING, R.M. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med **104**(3A) : 2S-8S.

van't HOF, R.J., VON LINDERN, M., NIJWEIDE, P.J. et BEUG, H. (1997a) Stem cell factor stimulates chicken osteoclast activity in vitro. FASEB J **11** : 287-293.

- van'T HOF, R.J. et RALSTON, S.H. (1997) Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res* **12** : 1797-1804.
- van HILL, B., VANEK, M., RICHENER, H., GREEN, J.R. et BILBE, G. (1993) Cloning and tissue distribution of subunits C, D, and E of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* **197** : 15-21.
- VERNEJOUL, M. et MARIE, P. (1993) Cellules osseuses et remodelage osseux. *Med Sci* **9** : 1192-1203.
- VIGNERY, A., RAYMOND, M.J., QIAN, H.J., WANG, F. et ROSENZWEIG, S.A. (1991) Multinucleated rat alveolar macrophages express functional receptors for calcitonin. *Am J Physiol* **261** : F1026-F1032.
- VON EULER, U.S. (1935) Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata-und Samenblasensekretes. *Klin Wochenschr* **14** : 1182-1183.
- WADA, S., MARTIN, T.J. et FINDLAY, D.M. (1995) Homologous regulation of the calcitonin receptor in mouse osteoclast-like cells and human breast cancer T47D cells. *Endocrinology* **136**(6) : 2611-2621.
- WADA, S., AKATSU, T., TAMURA, T., TAKAHASHI, N., SUDA, T. et NAGATA, N. (1994) Glucocorticoid regulation of calcitonin receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *J Bone Miner Res* **9**(11):1705-1712.
- WADA, S., YASUDA, S., NAGAI, T., MAEDA, T., KITAHAMA, S., SUDA, S., FINDLAY, D.M., IITAKA, M. et KATAYAMA, S. (2001) Regulation of calcitonin receptor by glucocorticoid in human osteoclast-like cells prepared in

- vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology* **142**(4) : 1471-1478.
- WALKER, D.G. (1975) Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* **190**(4216) : 784-785.
- WALTHER, M.M., PATEL, B., CHOYKE, P.L., LUBENSKY, I.A., VOCKE, C.D., HARRIS, C., VENZON, D., BURTIS, W.J. et LINEHAN, W.M. (1997) Hypercalcemia in patients with metastatic renal cell carcinoma: effect of nephrectomy and metabolic evaluation. *J Urol* **158**(3 Pt 1) : 733-739.
- WANG, Z.Q., HEMKEN, P., MENTON, D. et GLUCK, S. (1992) Expression of vacuolar H(+)-ATPase in mouse osteoclasts during in vitro differentiation. *Am J Physiol.* **263**(2 Pt 2) : F277-283.
- WATABE, A., SUGIMOTO, Y., HONDA, A., IRIE, A., NAMBA, T., NEGISHI, M., ITO, S., NARUMIYA, S. et ICHIKAWA, A. (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* **268** : 20175-20178.
- WESOLOWSKI, G., DUONG, L.T., LAKKAKORPI, P.T., NAGY, R.M., TEZUKA, K., TANAKA, H., RODAN, G.A. et RODAN, S.B. (1995) Isolation and characterization of highly enriched, perfusion mouse osteoclastic cells. *Exp Cell Res* **219**(2) : 679-686.
- WHITTLE, B.J.R., HIGGS, G.A., EAKINS, K.E., MONCADA, S. et VANE, J.R. (1980) Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature (London)* **284** : 271-273.



- WILLIAM, J.P., BLAIR, H.C., MCDONALD, J.M., MCKENNA, M.A., JORDAN, S.E., WILLIFORD, J. et HARDY, R.W. (1997) Regulation of osteoclastic bone resorption by glucose. *Biochem Biophys Res Commun* **235** : 646-651.
- WILLIAMS, T.J. et PECK, M.J. (1977) Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* **270** : 530-532.
- WOODIEL, F.N., FALL, P.M. et RAISZ, L.G. (1996) Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae : Structure-activity relations and signal transduction pathway. *J Bone Miner Res* **11** : 1249-1255.
- WOODS, C., DOMENGET, C., SOLARI, F., GANDRILLON, O., LAZARIDES, E. et JURDIC, P. (1995) Antagonistic role of vitamin D3 and retinoic acid on the differentiation of chicken hematopoietic macrophages into osteoclast precursor cells. *Endocrinology* **136** : 85-95.
- WONG, E., DE LUCA, C., BOILY, C., CHARLSON, S., CROMLISH, W., DENIS, D., KARGMAN, S., KENNEDY, B.P., OUELLET, M., SKOREY, K., O'NEILL, G.P., VICKERS, P.J. et RIENDEAU, D. (1997) Characterization of autocrine inducible prostaglandin H synthase-2 (PGHS-2) in human osteosarcoma cells. *Inflamm Res* **46** : 51-59.
- WUCHERPFENNIG, A.L., STETLER-STEVENSON, W.G., ROSENBERG, A.E. et STASHENKO, P. (1994) Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts. *J Bone Miner Res* **9** : 549-556.
- XIE, W.L., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D.L., ERIKSON, R.L. et SIMMONS, D.L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7) : 2692-2696.

- YANG, J., XIA, M., GOETZL, E.J. et AN, S. (1994) Cloning and expression of the EP3 subtype of human receptors for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* **198** : 999-1006.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., MOCHIZUKI, S.I., YANO, K., FUJISE, N., SATO, Y., GOTO, M., YAMAGUCHI, K., KURIYAMA, M., KANNO, T., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T. et HIGASHIO, K. (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**(3) : 1329-1337.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., MOCHIZUKI, S., TOMOYASU, A., YANO, K., GOTO, M., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T., HIGASHIO, K., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N. et SUDA, T. (1998a) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(7) : 3597-3602.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., GOTO, M., MOCHIZUKI, S.I., TSUDA, E., MORINAGA, T., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., SUDA, T., HIGASHIO, K. (1999) A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*. **25**(1) : 109-113.
- YOKOYAMA, C. et TANABE, T. (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **165**(2) : 888-894.

ZAMBONIN ZALLONE, A., TETI, A. et PRIMAVERA, M.V. (1982) Isolated osteoclasts in primary culture : first observations on structure and survival in culture media. *Anat Embryol (Berl)* **165** : 405-413.

ZIOLKOWSKA, M., KUROWSKA, M., RADZIKOWSKA, A., LUSZCZYKIEWICZ, G., WILAND, P., DZIEWCZOPOLSKI, W., FILIPOWICZ-SOSNOWSKA, A., PAZDUR, J., SZECHINSKI, J., KOWALCZEWSKI, J., RELL-BAKALARSKA, M. et MASLINSKI, W. (2002) High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* **46**(7):1744-1753.